



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração: Biociências

Renata Simão Saadi

**Modulação da virulência de três microrganismos
buciais por substitutos de açúcar**

Curitiba

2017

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração: Biociências

**Modulação da virulência de três microrganismos
buciais por substitutos de açúcar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para defesa pública e obtenção do título de Doutor.

Curitiba

2017

Saadi, Renata Simão

S111m Modulação da virulência de três microrganismos bucais por substitutos
de
2017 açúcar / Renata Simão Saadi ; orientador: Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa.
– 2017.

35 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2017

Inclui bibliografias

1. Odontologia. 2. Biofilme, 3. Candida albicans. 4. Streptococcus mutans.
5. Streptococcus sanguis. 6. Virulência. I. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro.
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6

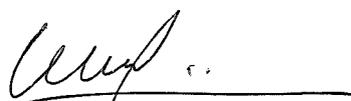
TERMO DE APROVAÇÃO

RENATA SIMÃO SAADI

**MODULAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE TRÊS MICRORGANISMOS BUCAIS POR
SUBSTITUTOS DE AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Biociências**.

Orientador (a):


Prof. Dr. Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof.ª Dr.ª Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof.ª Dr.ª Marcia Regina Beux
Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, UFPR


Prof. Dr. Ramiro Mendonça Murata
School of Dental Medicine, EUA

Curitiba, 23 de outubro de 2017.

***“Determinação, coragem e autoconfiança
são fatores decisivos para o sucesso.
Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades.
Se estamos possuídos de uma inabalável determinação,
conseguiremos superá-los.
Independentemente das circunstâncias, devemos
ser sempre humildes, recatados e
despidos de orgulho”
(Dalai Lama)***

DEDICATÓRIA

À Deus por me presentear com o dom da vida e me permitir realizar
mais essa conquista.
Sem Ele eu não estaria aqui.

Aos meus pais, Nasim Saadi e Lourdes Simão Saadi, pela dedicação,
carinho, e esforços, para que eu sempre pudesse ir em busca dos meus
sonhos. Ele, hoje, já não mais comigo pessoalmente, mas ligado
eternamente pelo coração.

Ao meu filho, Leonardo Saadi Lopes, pelo carinho, paciência e
compreensão em meus momentos de ausência.

Ao meu marido, Ricardo Lopes Silva, pela amizade
de sempre.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, que não se limitou em transmitir seu conhecimento, exemplo de dedicação e competência, caminhando junto sem me abandonar... eterna gratidão e respeito

À Rosimeire Takaki Rosa, Meire, que mais que uma mestre, amiga, que com paciência, me ensinou tudo o que sei e o que esqueci, sem me deixar sozinha por um minuto, sem me deixar desistir nos meus momentos de desespero, e por acreditar que tudo vai dar certo

Ao professor, Sérgio Aparecido Ignácio, pela análise estatística, paciência e disponibilidade em explicá-la.

Às minhas colegas de curso, pelo apoio e troca de experiência.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Odontologia, Neide Reis Borges e Flávia Beuting por todo o suporte, apoio e competência.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biociências pela inestimável colaboração.

Aos professores que ministraram aulas, pelos ensinamentos transmitidos

1 **Resumo**

2 **Objetivos:**

3 Substitutos de açúcar (ou adoçantes) são extensivamente consumidos
4 principalmente pelas populações de diabéticos e de obesos. Embora alguns
5 estudos tenham avaliado o papel desses compostos na facilitação de
6 crescimento microbiano bucal, modulações na virulência bacteriana e/ou
7 fúngicas são praticamente desconhecidas.

8 **Desenho:**

9 Neste estudo buscou-se verificar tais modulações para *Streptococcus*
10 *sanguinis* ATCC®10556™, *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ e *Candida*
11 *albicans* SC5314. Foram avaliadas (i) a interferência na adesão, (ii) a
12 capacidade de formação de biofilmes dinâmicos, (iii) a secreção de proteases
13 por esses biofilmes e (iv) a secreção de hemolisinas por esses biofilmes,
14 quando desafiados por aspartame, ciclamato de sódio, sacarina e xilitol, em
15 concentrações próximas àquelas encontradas na saliva de consumidores.

16 **Resultados:**

17 Aspartame e ciclamato elevam a taxa de adesão de *S. sanguinis* ($p \leq 0,009$) e
18 *Streptococcus mutans* ($p < 0,001$); os quatro adoçantes elevaram a adesão de
19 *C. albicans* ($p \leq 0,042$). Maiores massas de células planctônicas e biofilme
20 foram obtidas com xilitol para *S. sanguinis* ($p \leq 0,003$) e sacarina induziu
21 redução na biomassa de *C. albicans* ($p = 0,045$). Fatores solúveis fúngicos não
22 sofreram quaisquer alterações quando da presença de substitutos de açúcar (p
23 $\geq 0,048$), exceto, ciclamato K que reduziu a secreção de hemolisinas ($p =$
24 $0,034$).

25

1 Conclusões:

2 Em posse dos resultados obtidos conclui-se que os substitutos de açúcar aqui
3 analisados não elevam os fatores de virulência microbiana.

4

5 **Palavras chave:** Substitutos de açúcar, Biofilmes, *Candida albicans*,
6 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, Virulência.

1 **Abstract**

2 Objectives:

3 Sugar substitutes (or sweeteners) are extensively consumed, especially in
4 diabetic and obese populations. Even though some studies have examined the
5 role of these compounds in facilitating oral microbial growth, modulations in
6 bacterial and/or fungal virulence remain practically unknown.

7 Design:

8 This study attempted to verify the occurrence of such modulations in
9 *Streptococcus sanguinis* ATCC[®]10556[™], *Streptococcus mutans*
10 ATCC[®]25175[™] and *Candida albicans* SC5314. The study assessed (i) the
11 interference of adhesion, (ii) the ability to form dynamic biofilms, (iii) the
12 protease secreted by such biofilms and (iv) the hemolysins secreted by these
13 biofilms where challenged by aspartame, sodium cyclamate, saccharin and
14 xylitol, in concentrations approximating those found in the saliva of consumers.

15 Results:

16 Aspartame and cyclamate were found to increase the adhesion rate of *S.*
17 *sanguinis* ($p \leq 0.009$) and *Streptococcus mutans* ($p < 0.001$); all four
18 sweeteners increased the adhesion rate of *C. albicans* ($p \leq 0.042$). Larger
19 masses of planktonic cells and biofilm resulted from xylitol for *S. sanguinis* ($p \leq$
20 0.003) and saccharin induced reduction of biomass of *C. albicans* ($p = 0.045$).
21 Soluble fungal factors showed no observable changes in the presence of sugar
22 substitutes ($p \geq 0.048$), except for cyclamate K, which reduced the secretion of
23 hemolysins ($p = 0.034$).

24

25

1 Conclusions:

2 The findings support the conclusion that the sugar substitutes assessed do not
3 increase microbial virulence factors.

4

5 **Keywords:** Sugar substitutes, Biofilms, *Candida albicans*, *Streptococcus*
6 *mutans*, *Streptococcus sanguinis*, Virulence.

SUMÁRIO

Resumo	VI
Abstract	VIII
Introdução.....	1
Material e Métodos	2
Resultados e Discussão	7
Referências	13
Introduction	17
Material and Methods	18
Results and Discussion	22
References.....	28

1 INTRODUÇÃO

2 A demanda por substitutos de açúcar cresce em função do concomitante
3 aumento na taxa de diabéticos e de obesos no meio urbano. Em termos de
4 mercado global, a expectativa de consumo de adoçantes de baixa-caloria para
5 2016 foi projetada para próximo de US\$ 9,9 bilhões (Person, 2011).

6 Embora considerados seguros em relação a um pretenso potencial
7 mutagênico, aspartame, acesulfame K e sacarina(Bandyopadhyay, Ghoshal, &
8 Mukherjee, 2008), dentre outros, ainda são tratados com relativa suspeição por
9 parte da população.

10 Dada à alta diversidade química das moléculas empregadas como
11 adoçantes, as interações com microrganismos bucais são muito variadas. Por
12 um lado, existem relatos de que aspartame, sacarina e sucralose apresentam
13 atividade inibitória sobre *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter*
14 *actinomycetemcomitans* (Prashant, Patil, Nagaraj, & Patel, 2012); por outro, foi
15 determinado que aspartame, acesulfame K e sacarina podem inibir ou favorecer
16 o crescimento de *Streptococcus mutans*, dependendo da concentração
17 (Linke,1983). Fenômeno de adaptação com surgimento de mutantes resistentes
18 também foi reportado para estreptococos cariogênicos em relação ao xilitol
19 Trahan, Bourgeau, & Breton,1996).

20 Contudo, a despeito dos achados acima relatados, o risco potencial de
21 incremento da agressividade de agentes bacterianos ou fúngicos bucais foi, até
22 o momento, somente avaliado de forma superficial. Avaliações mais
23 aprofundadas, no que tange a virulência microbiana modulada por essa classe
24 de xenobióticos, praticamente inexistem.

25 Dada à inconsistência e, mesmo, à falta de informações acerca das
26 interações entre adoçantes e microrganismos bucais, a proposição central deste

1 estudo foi determinar (i) a interferência na adesão, (ii) a capacidade de formação
2 de biofilme, (iii) a secreção de proteases e (iv) de hemolisinas, por *Streptococcus*
3 *sanguinis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* quando desafiados por
4 aspartame, ciclamato de sódio, sacarina e xilitol.

5 MATERIAL E MÉTODOS

6 Cepas

7 Foram empregadas as cepas constantes na tabela 1. Elas foram crescidas
8 em meios de cultura específicos e em mesma condição atmosférica
9 microaerofílica e capnofílica.

10

Tabela 1. Microrganismos e condições de crescimento microbiano

Microrganismo/cepa	Meio de cultura	Atmosfera	Temperatura
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC®10556™	BHI	N ₂ 80% +	35 °C
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175™		O ₂ 10% +	
<i>Candida albicans</i> SC5314	YNB	CO ₂ 10%	

11

12

13 Adoçantes

14 Foram empregados os substitutos de açúcar aspartame, ciclamato de
15 sódio, sacarina e xilitol. Todos apresentavam pureza grau farmacêutico (Fooding
16 Group Ltd, Shanghai, China).

17 Quando da utilização, os adoçantes foram dissolvidos em água reagente
18 tipo II até concentrações 100 vezes superiores àquelas preconizadas por Li et al
19 (2002). A saber, aspartame 250 mM, ciclamato Na 500 mM, sacarina 100 mM e
20 xilitol 100 mM. Após a dissolução completa dos solutos, as soluções foram
21 filtradas em membrana 0,22 µm e acondicionadas em frascos esterilizados, a
22 5°C e ao abrigo da luz.

23

1 **Adesão celular**

2 Os microrganismos foram adicionados aos meios+adoçantes até obtenção
3 de suspensões contendo ca. 1×10^7 células.mL⁻¹. Os tubos selados contendo os
4 ensaios, em volume de 5 mL, foram incubados em atmosfera com pCO₂ 10% e
5 37 °C, por 48 h. Homogeneizações foram obtidas com homogeneizador para
6 sangue a 6 rpm.

7 As células foram recolhidas por centrifugação (10000 ×g; 5 min) e lavadas
8 com NaCl 145 mM estéril (3×). Os sedimentos foram desagregados em vórtex
9 de 2000 rpm e receberam alíquotas de 5 mL de água destilada estéril. Essas
10 células foram mantidas em 37 °C e utilizadas em um intervalo de 2 h.

11 Lâminas de microscopia desengorduradas com éter etílico foram
12 autoclavadas dentro de copos de polipropileno para coloração, com selagem
13 hermética. Solução de L-arginina 1% estéril foi adicionada aos copos estáticos
14 até cobrir a extensão de 6 cm. A solução foi mantida por 2 h, a 37 °C. Após, foi
15 drenada e os copos receberam as suspensões microbianas. As suspensões
16 foram mantidas a 37 °C, por 2 h e 6 rpm, em homogeneizador de sangue AP22
17 (Phoenix-Luferco Ind Com, Araraquara, Brasil).

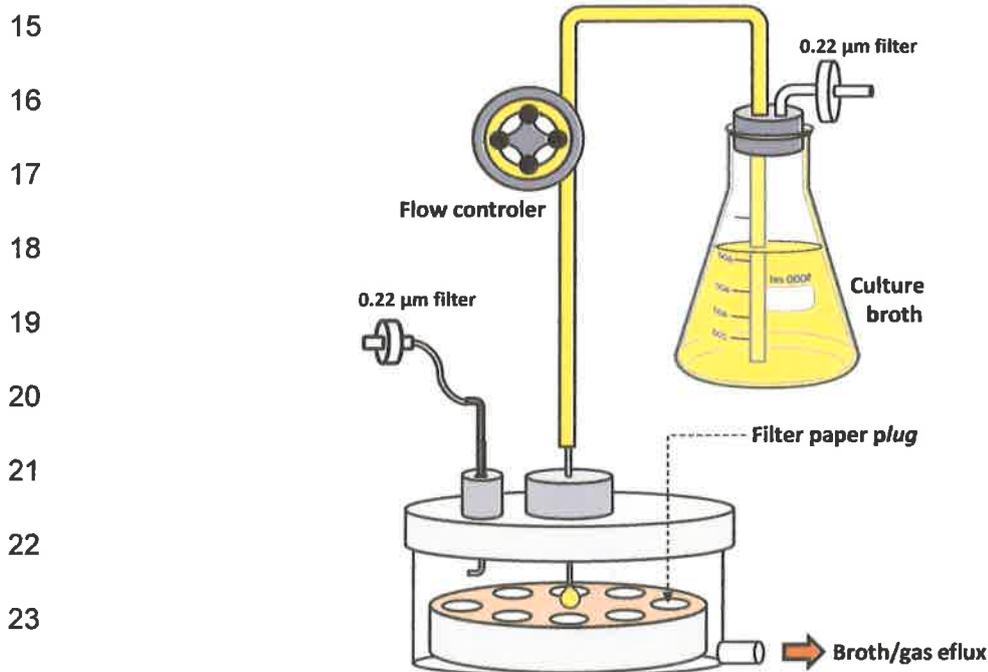
18 As suspensões foram drenadas e as lâminas foram lavadas com NaCl 145
19 mM estéril (3×). Foram adicionados volumes de cristal violeta 1% até cobrir 5 cm
20 de extensão das lâminas e essas foram coradas por 10 min. As lâminas foram
21 lavadas com água destilada (5×) e o corante foi extraído com 1 mL de álcool
22 isopropílico. As absorbâncias dos eluatos foram determinadas em 540 nm, em
23 leitora de placas TP-Reader (Thermo Plate Inc. China). Esses valores foram
24 referentes a área de 25 cm². Comparações foram realizadas com lâminas
25 somente recobertas por L-arginina (basal) e culturas não desafiadas com
26 adoçantes (controle-negativo).

1 **Formação de biofilmes**

2 Os diferentes microrganismos foram crescidos de forma planctônica, como
3 descrito acima.

4 Discos de papel-filtro de 80 mm foram esterilizados em autoclave e secos
5 em estufa. Sobre eles, foram dispensados 30 discos estéreis de papel para
6 antibiograma de 0,5 mm (Cefar Diagnóstica Ltda), de forma a cobrir sua
7 periferia, mas sem sobreposição desses discos. Nesses discos de
8 antibiograma foram dispensados 10 μL de suspensões padronizadas crescidas
9 em presença dos adoçantes.

10 Esse conjunto foi inserido em Biorreator para Biofilmes sobre Papel (Selow,
11 Rymovicz, Ribas, Saadi, Rosa, & Rosa, 2015) (PEBR, Figura 1) que recebeu
12 fluxo contínuo de meios de cultura contendo os diferentes adoçantes, na vazão
13 de ca. 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os discos foram incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$, e atmosfera de N_2 80%,
14 O_2 10%, CO_2 10%, por 72 h.



25 **Figura 1.** Biorreator para Biofilmes sobre Papel (PEBR).

26

1 **Atividade proteolítica dos biofilmes**

2 Após o término das incubações, os sistemas foram desmontados e 10
3 discos contendo biofilmes foram removidos e inseridos verticalmente em
4 microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram preenchidos com 800 µL de solução
5 contendo BSA 0,2 mg.mL⁻¹, tampão citrato de sódio 10 mM e ácido cítrico 10
6 mM (pH 5,0), e foram incubados a 37 °C, por 4 h e 100 rpm. Decorrido o tempo
7 de digestão, alíquotas de 100 µL de sobrenadantes foram combinadas com
8 volumes de 100 µL de solução de Coomassie (Brilliant blue G-250 0,025%,
9 etanol 11,75%, ácido fosfórico 21,25%) em placas de microtitulação de fundo
10 chato de 96 poços. Após 5 min, as densidades ópticas das misturas foram
11 determinadas em 540 nm. Como controles, foram utilizadas repetições de
12 solução de Coomassie com água deionizada (*blank*) e repetições da solução
13 BSA/citrato com solução de Coomassie (*basal concentration*).

14 Uma unidade enzimática foi arbitrariamente determinada como sendo a
15 quantidade de enzima capaz de promover a digestão de um micrograma de
16 BSA, por mililitro, por minuto. Unidades de atividade proteolítica pela
17 absorvância da redução de MTT (abaixo) foram tomadas como atividade
18 proteolítica específica.

19

20 **Atividade hemolítica dos biofilmes**

21 Após o término da incubação, os sistemas foram desmontados e os plugs
22 foram removidos; lavados delicadamente em água estéril, por imersão; e
23 inseridos verticalmente em poços de placas de cultura de tecidos com 24 poços.
24 Os poços foram preenchidos com 3 mL de suspensão de eritrócitos de carneiro
25 1% [em Tris- HCl 10 mM contendo NaCl 145 mM (pH 7,5)] e foram incubados a
26 37 °C, em agitação de 100 rpm. Após 4 h de incubação, os plugs foram

1 removidos e as suspensões foram sedimentadas a 5 °C, por 15 h. As OD₅₄₀ dos
2 sobrenadantes foram determinadas. Os controles negativos tiveram iguais
3 volumes de tampão e de suspensão de eritrócitos sedimentados a 5 °C, por 15
4 h.

5 Uma unidade hemolítica foi arbitrariamente definida com base na alteração
6 de absorvância por minuto de incubação a 37 °C. Unidades de atividade
7 hemolítica pelas absorvâncias da redução de MTT (abaixo) foram tomadas como
8 atividade hemolítica específica.

9

10 **Atividade metabólica dos biofilmes**

11 Após o término da incubação, com os sistemas desmontados, outros 10
12 discos foram removidos e inseridos verticalmente em microplaca fundo U de 96
13 poços. Os poços foram preenchidos com 100 µL de MTT 1 mg.mL⁻¹ a cada
14 poço-teste, assim como aos poços-controle, que continham discos estéreis sem
15 biofilme. Não foi adicionado nenhum ativador metabólico (e.g. D-glutamina ou D-
16 glucose). As placas foram incubadas no escuro, a 37 °C, por 4 h e 100 rpm.
17 Após a incubação, o MTT não reativo foi drenado por aspiração e 200 µL de
18 álcool isopropílico foram acrescentados. Passados 5 min, 100 µL do
19 sobrenadante foram transferidos para microplacas de fundo chato de 96 poços e
20 as alterações de cor foram medidas em 540 nm.

21

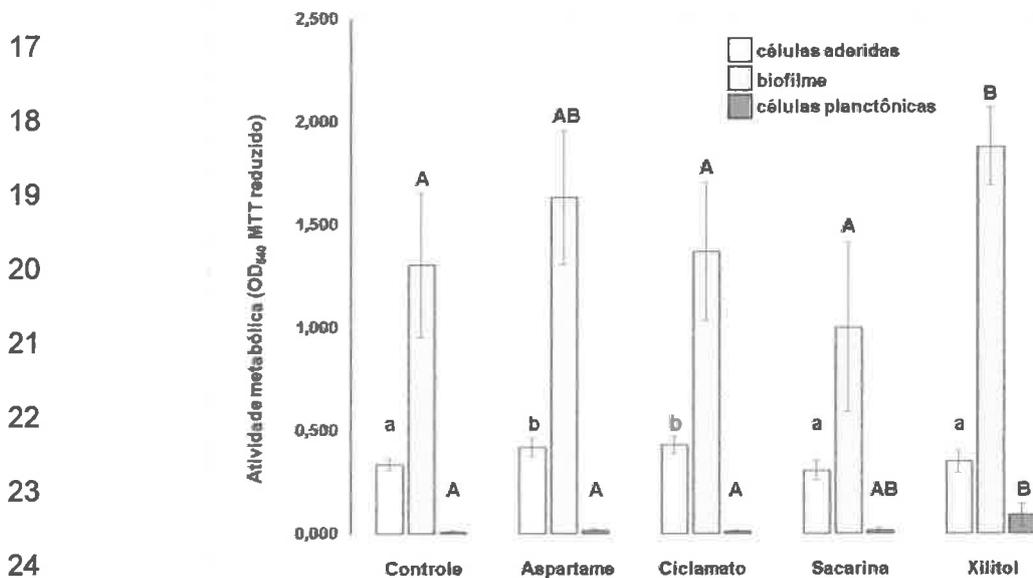
22 **Estatística**

23 Todos os testes acima descritos foram conduzidos com, ao menos, 30
24 repetições. Os dados foram testados quanto à sua normalidade de distribuição
25 (*Lilliefors test*) e homogeneidade (*Levene test*). As diferenças foram acessadas
26 após análise por ANOVA, seguida de comparações múltiplas (*Tukey HSD test*),

1 com intervalo de confiança de 95% e $p < 0,05$. Foi empregado o pacote
2 estatístico SPSS 20.0 (IBM Co.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 A virulência dos biofilmes bucais é influenciada por inúmeros fatores.
5 Qualquer substância que seja introduzida, ainda que por breves intervalos de
6 tempo, no microcosmo dos biofilmes pode virtualmente interferir na expressão
7 de fatores de virulência (Rymovicz, Ronsani, Grégio, Guariza-Filho, Tanaka, &
8 Rosa, 2013; Andrades, Ribas, Rymovicz, Grégio, & Rosa, 2013; Mores, Souza,
9 Cavalca, de Paula e Carvalho, Gursky, Rosa, Samaranayake, & Rosa, 2011;
10 Carvalho, Gursky, Rosa, Rymovicz, Campelo, Grégio, Koga-Ito, Samaranayake,
11 & Rosa, 2010; Carvalho, Gursky, Rosa, Rymovicz, Campelo, Grégio, Koga-Ito,
12 Samaranayake, & Rosa, 2010; Baboni, Barp, Izidoro, Samaranayake, & Rosa,
13 2009; Ueta, Tanida, Yoneda, Yamamoto, & Osaki, 2001). Nesse contexto, o
14 consumo de substitutos de açúcar se mostra como um assunto controverso e
15 muito pouca informação está disponível no que tange à modulação de virulência
16 microbiana.



25 **Figura 2.** Carga microbiana estimada pela taxa de atividade metabólica de biofilmes dinâmicos de *S. sanguinis* ATCC[®]10556[™]. Letras diferentes sobre as barras de intervalo de confiança 95% indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) para grupos.

1 A despeito de suas particularidades, neste estudo buscamos avaliar tais
2 possibilidades de modulação de virulência em três organismos comuns do
3 microbioma bucal (Terefework, Pham, Prosperi, Entius, Errami, Van Spanning,
4 Zaura, Ten Cate, & Crielaard, 2008) que estão envolvidos em processos de
5 doença seja como patógenos estritos ou oportunistas, seja como colonizadores
6 primários que precedem a formação de placa dental.

7 Os resultados obtidos mostram que aspartame e ciclamato elevam a taxa
8 de adesão de *S. sanguinis* ATCC®10556™ ($p \leq 0,009$) em superfícies recobertas
9 por película adquirida (Figura 2); contudo isso não reflete em maior quantidade
10 final de biofilme, se comparado com controle. A medida da atividade metabólica
11 de biofilmes, que é um parâmetro para estimar suas quantidades, revelou que os
12 dois adoçantes não induziram qualquer elevação, em comparação com o
13 controle ($p \geq 0,081$). Por outro lado, o xilitol, que não havia aumentado a adesão
14 gerou maior medida de atividade metabólica ($p < 0,001$). Seguindo o mesmo
15 comportamento, o cultivo planctônico se mostrou mais celularizado quando o
16 xilitol estava presente ($p < 0,003$).

17 O achado de que xilitol eleva o crescimento de biofilmes de *S. sanguinis*
18 contrasta com os de estudos anteriores no qual o xilitol interferiu negativamente
19 na formação de biofilmes (Söderling, & Hietala-Lenkkeri, 2010) . É possível que
20 diferenças metodológicas tenham sido decisivas para tais incompatibilidades.
21 Em nosso estudo, o sistema de formação de biofilmes dinâmicos deve ter
22 evitado o acúmulo de sub-produtos metabólicos que comprometem a formação
23 de biofilmes.

24 Neste estudo, foi avaliado como o *S. mutans* se comporta quando exposto
25 em um meio com adoçantes, uma vez que esses não podem ser metabolizados
26 pelo microrganismo em ácidos para produção de energia.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

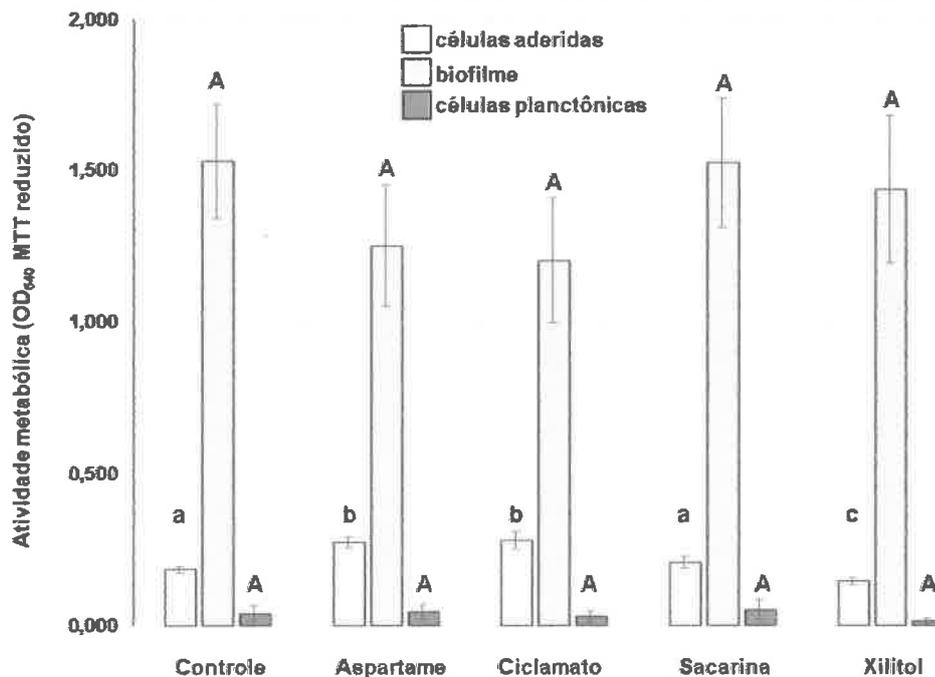


Figura 3. Carga microbiana estimada pela taxa de atividade metabólica de biofilmes dinâmicos de *S. mutans* ATCC[®]25175[™]. Letras diferentes sobre as barras de intervalo de confiança 95% indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) para grupos.

A adesão celular, elevada para aspartame e ciclamato e reduzida para xilitol, não se traduziu em maiores quantidades de biofilme ($p > 0,056$) (Figura 3). Tal fato nos causou certa apreensão, posto que outros grupos já haviam demonstrado o papel redutor de substitutos de açúcar em populações de estreptococos cariogênicos (Trahan, 1995; Vadeboncoeur, Trahan, Mouton, & Mayrand, 1983; Söderling, Hirvonen, Karjalainen, Fontana, Catt, & Seppä, 2011; Haghgoo, Afshari, Ghanaat, & Aghazadeh, 2015; Alamoudi, Hanno, Almushayt, Masoud, El Ashiry, & El Derwi, 2014; Giacaman, Campos, Muñoz-Sandoval, & Castro, 2013; Das, Das, Murphy, & Worawongvasu, 1991). Uma vez mais, nos parece que o não-acúmulo de produtos de excreção em nosso sistema de biofilme dinâmico é o responsável por contrastes de resultados. Mesmo assim, o fato de que adoçantes não elevam as populações de organismos cariogênicos é deveras interessante.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

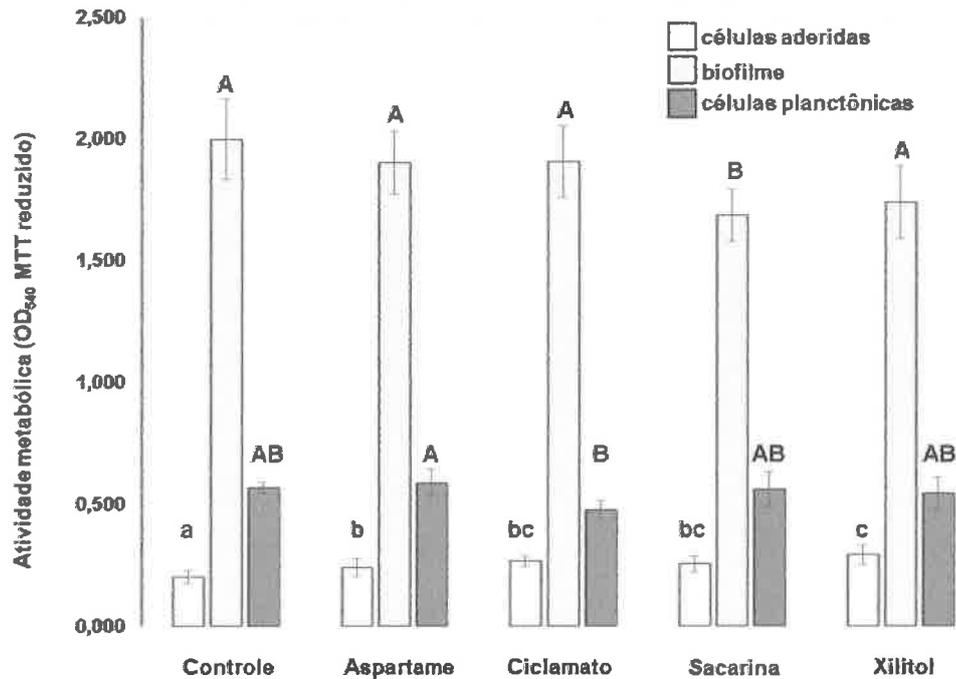
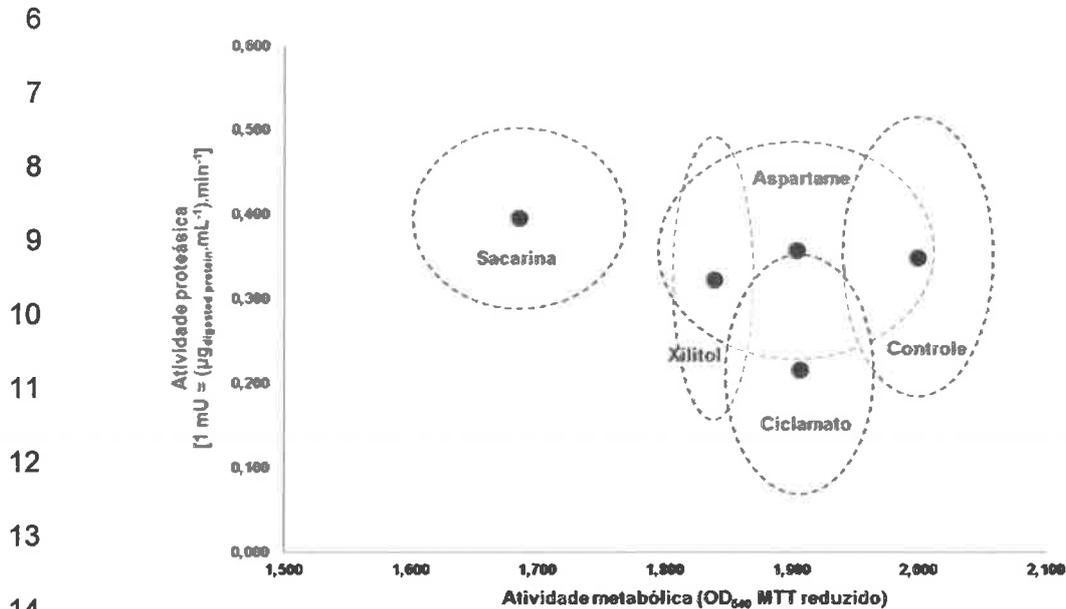


Figura 4. Carga microbiana estimada pela taxa de atividade metabólica de biofilmes dinâmicos de *C. albicans* SC5314. Letras diferentes sobre as barras de intervalo de confiança 95% indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) para grupos.

A *C. albicans* quando exposta ao aspartame, ciclamato, sacarina e xilitol mostrou um aumento na adesividade ($p \leq 0,042$) (Figura 4). Porém, esse aumento não se traduziu em aumento de biofilmes, que se mostraram semelhantes (aspartame, ciclamato e xilitol; $p \geq 0,710$) ou mesmo menores (sacarina; $p = 0,045$) que o controle. O crescimento planctônico na presença dos adoçantes foi semelhante ao grupo controle ($p \geq 0,078$). Tais resultados mostram que os substitutos de açúcar não devem favorecer qualquer aumento nas populações de *C. albicans*. Isso se torna interessante, pois dietas contendo açúcares favorecem o crescimento fúngico (Cannon, Holmes, Mason, & Monk, 1995; Pizzo, Giuliana, Milici, & Giangreco, (2000).

1 Em relação aos fatores de virulência solúveis, obteve-se que nenhum dos
2 substitutos ensaiados elevou a secreção de proteases (Figura 5) ou de
3 hemolisinas (Figura 6); o ciclamato, inclusive, reduziu a secreção de hemolisinas
4 ($p = 0,034$) nos biofilmes. Em termos de virulência, tais dados são apreciáveis
5 pois mostram a inocuidade dos adoçantes na virulência fúngica.



14 **Figura 5.** Distribuição espacial das médias de biomassa estimada pela atividade metabólica e de atividade proteolítica de *C. albicans* SC5314. Os diâmetros horizontais das elipses indicam os intervalos de confiança (IC95%) para as medidas de biomassa e os diâmetros verticais indicam os IC95% para atividade proteolítica.

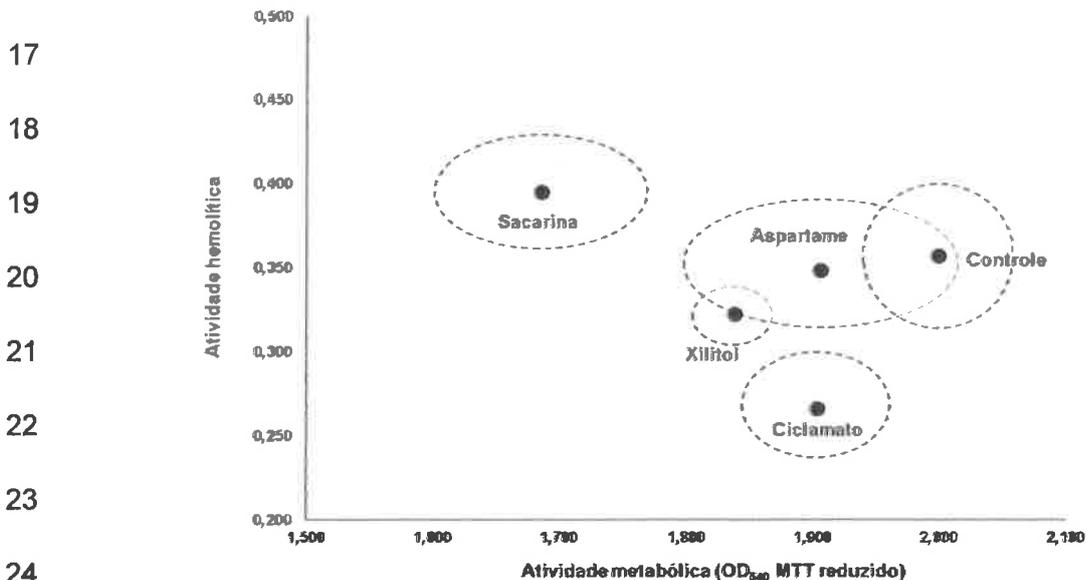


Figura 6. Distribuição espacial das médias de biomassa estimada pela atividade metabólica e de atividade hemolítica de *C. albicans* SC5314. Os diâmetros horizontais das elipses indicam os intervalos de confiança (IC95%) para as medidas de biomassa e os diâmetros verticais indicam os IC95% para atividade proteolítica.

- 1 Em posse dos resultados obtidos com biofilmes dinâmicos conclui-se que
- 2 os substitutos de açúcar aqui analisados não elevam os fatores de virulência
- 3 microbiana diferentemente do que ocorre com outros xenobióticos

REFERÊNCIAS

- 1- Alamoudi, N.M., Hanno, A.G., Almushayt, A.S., Masoud, M.I., El Ashiry, E.A., & El Derwi, D.A. (2014). Early prevention of childhood caries with maternal xylitol consumption. *Saudi Med Journal*, 35(6), 592-597.
- 2- Andrades, K.M., Ribas, C.R., Rymovicz, A.U., Grégio, A.M., & Rosa E.A. (2013). Modulation of *Candida albicans* virulence by antirejection immunosuppressant drugs. *Transplantation*, 95(3), e 16-18.
- 3- Baboni, F.B., Barp, D., Izidoro, A.C., Samaranayake, L.P., & Rosa, E.A. (2009). Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. *Mycopathologia*, 168(5), 227-235.
- 4- Baboni, F.B., Guariza, Filho O., Moreno, A.N., & Rosa, E.A. (2010). Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *American Journal Orthodontic Dentofacial Orthopedics*, 138(4), 427-434.
- 5- Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S., & Mukherjee, A. (2008) Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug and Chemical Toxicology*, 31(4), 447- 457.
- 6- Cannon, R.D., Holmes, A.R., Mason, A.B., & Monk, B.C. (1995) Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *Journal of Dental Research*, 74(5), 1152-1161.

- 7- Carvalho, A.P., Gursky, L.C., Rosa, R.T., Rymovicz, A.U., Campelo, P.M., Grégio, A.M., Koga-Ito, C.Y., Samaranayake, L.P., & Rosa, E.A. (2010). Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*, 49(6), 315-322.
- 8- Das, S., Das, A.K., Murphy, R.A., & Worawongvasu, R. (1991) Aspartame and dental caries in the rat. *Journal of Pediatric Dentistry*, 13(4), 217-220.
- 9- Giacaman, R.A., Campos, P., Muñoz-Sandoval, C., & Castro, R.J. (2013) Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Archives of Oral Biology*, 58(9), 1116-1122.
- 10- Haghgoo, R., Afshari, E., Ghanaat, T., & Aghazadeh, S. (2015) Comparing the efficacy of xylitol-containing and conventional chewing gums in reducing salivary counts of *Streptococcus mutans*: An in vivo study. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(2), 112-117.
- 11- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, Apr 2;99(7), 4692-4696.
- 12- Linke, H.A. (1983) Adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces in the presence of artificial sweeteners. *Microbios*, 36(143), 41-45.
- 13- Mores, A.U., Souza, R.D., Cavalca, L., de Paula e Carvalho, A., Gursky, L.C., Rosa, R.T., Samaranayake, L.P., & Rosa, E.A. (2011). Enhancement of secretory aspartyl protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses*, 54(3), 195-201.

- 14- Person, T. (2011). Sweeteners Rising. Consumer attention is finally focused on the sweetener revolution. *WholeFoods Magazine* <http://www.wholefoodsmagazine.com/grocery/features/sweeteners-rising>.
- 15- Pizzo, G., Giuliana, G., Milici, M.E., & Giangreco, R. (2000) Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. *New Microbiology*, 23(1), 63-71.
- 16- Prashant, G.M., Patil, R.B., Nagaraj, T., & Patel, V.B. (2012) The antimicrobial activity of the three commercially available intense sweeteners against common periodontal pathogens: an in vitro study. *Journal Contemporary Dental Practice*, 13(6), 749-752.
- 17- Rymovicz, A.U., Ronsani, M.M., Grégio, A.M., Guariza-Filho, O.G., Tanaka, O., & Rosa, E.A. (2013) Virulence modulation of *Streptococcus mutans* biofilms by metal ions released from orthodontic appliances. *Angle Orthodontic*, 83(6), 987-993.
- 18- Selow, M.L., Rymovicz, A.U., Ribas, C.R., Saad, R.S., Rosa, R.T., & Rosa, E.A. (2015) Growing *Candida albicans* biofilms on paper support and dynamic conditions. *Mycopathologia*, 180(1-2), 27-33.
- 19- Söderling, E.M., & Hietala-Lenkkeri, A.M. (2010) Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. *Current Microbiology*, 60(1), 25-29.
- 20- Söderling, E., Hirvonen, A., Karjalainen, S., Fontana, M., Catt, D., & Seppä, L. (2011). The effect of xylitol on the composition of the oral flora: a pilot study. *European Journal of Dentistry*, Jan 5(1), 24-31.

- 21- Terefework, Z., Pham, C.L., Prosperi, A.C., Entius, M.M., Errami, A., Van Spanning, R.J., Zaura, E., Ten Cate, J.M., & Crielaard, W. (2008) MLPA diagnostics of complex microbial communities: relative quantification of bacterial species in oral biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 75(3), 558-565.
- 22- Trahan, L. (1995) Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *International Dental Journal*, 45(1 Suppl 1), 77-92
- 23- Trahan, L., Bourgeau, G., & Breton, R. (1996). Emergence of multiple xylitol-resistant (fructose PTS-) mutants from human isolates of mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. *Journal of Dental Research*, 75(11),1892-900.
- 24- Ueta, E., Tanida, T., Yoneda, K., Yamamoto, T., & Osaki, T. (2001) Increase of *Candida* cell virulence by anticancer drugs and irradiation. *Oral Microbiology Immunology*, 16(4), 243-249.
- 25- Vadeboncoeur, C., Trahan, L., Mouton, C., & Mayrand, D. Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *Journal of Dental Research*, 62(8), 882-884.

INTRODUCTION

The demand for sugar substitutes has been increasing proportionately with the rate of diabetic and obese populations in urban areas. Globally, consumption of low-calorie sweeteners in 2016 has been projected to be approximately US\$ 9.9 billion (Person, 2011).

Despite being considered safe regarding their purported mutagenic potential, aspartame, acesulfame K and saccharin (Bandyopadhyay, Ghoshal, & Mukherjee, 2008), among others, are still regarded somewhat suspiciously by the general population.

Given the high chemical diversity of molecules employed in sweeteners, the interactions between oral microorganisms can vary greatly. On the one hand, some reports say that aspartame, saccharin and sucralose inhibit *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Prashant, Patil, Nagaraj, & Patel, 2012). On the other hand, it has been found that aspartame, acesulfame K and saccharin may either inhibit or favor the growth of *Streptococcus mutans*, depending on their level of concentration (Linke, 1983). Adaptive phenomenon from the emergence of resistant mutants has also been reported for cariogenic streptococci in connection with xylitol (Trahan, Bourgeau, & Breton, 1996).

However, despite the aforementioned findings, the potential risk of an incremental rise in the virulence of oral bacterial or fungal agents has been only superficially assessed to date. With regard to modulated microbial virulence by this class of xenobiotics, further assessments are practically unknown.

Given the inconsistency, and even lack, of data about the interactions between sweeteners and oral microorganisms, the core objective of the present study was to determine: (i) the interference in adhesion, (ii) the ability to form

biofilms, (iii) the secretion of proteases and (iv) of hemolysins, by *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* when challenged by aspartame, sodium cyclamate, saccharin and xylitol.

MATERIALS AND METHODS

Strains

The strains employed are shown in table 1. These were grown in specific culture media and under the same microaerophilic and capnophilic atmospheric conditions.

Table 1. Microorganisms and microbial growth conditions

Microorganism/strain	Culture medium	Atmosphere	Temperature
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC®10556™	BHI	N ₂ 80% + O ₂ 10% + CO ₂ 10%	35 °C
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175™			
<i>Candida albicans</i> SC5314	YNB		

Sweeteners

The sugar substitutes employed were aspartame, sodium cyclamate, saccharin and xylitol. All of them displayed pharmaceutical-grade purity (Fooding Group Ltd, Shanghai, China).

The sweeteners were dissolved in Type II reagent water at concentrations up to 100 times higher than those advocated by Li et al (2002). Namely, aspartame 250 mM, cyclamate Na 500 mM, saccharin 100 mM and xylitol 100 mM. After complete dissolution of solutes, solutions were filtered with a 0.22 µm membrane and stored in sterile vials at 5 °C and away from light.

Cell adhesion

The microorganisms were added to the media+sweeteners until suspensions containing ca. 1×10^7 células.mL⁻¹ were obtained. The sealed tubes containing 5mL assays were incubated at an atmosphere with pCO₂ 10% at 37 °C for 48 h. Homogenization was obtained with a blood homogenizer at 6 rpm.

The cells were collected by centrifugation (10000 ×g; 5 min) and washed with a sterile NaCl 145 mM solution (3×). The sediments were vortexed at 2000 rpm and received 5 mL aliquots of sterile distilled water. These cells were stored at 37 °C and used after an interval of 2 hours.

Microscope slides were degreased with ethyl ether and were autoclaved inside polypropylene cups for staining, with hermetic sealing. A sterile L-arginine 1% solution was added to the static cups to cover a 6 cm area. The solution was maintained for 2 h at 37 °C. It was then drained and the microbial suspensions were poured into the cups. The suspensions were maintained at 37 °C, for 2 hours and 6 rpm, in an AP22 blood homogenizer (Phoenix-Luferco Ind Com, Araraquara, Brazil).

The suspensions were drained and the slides were washed in a sterile NaCl 145 mM solution (3×). Volumes of gentian violet 1% were added to cover 5 cm of the area of slides, which were stained for 10 minutes. The slides were washed in distilled water (5×) and the dye was removed with 1 mL of isopropyl alcohol. The absorbancies of the eluates were determined in 540 nm, in a TP-Reader (Thermo Plate Inc. China) thermoplate. Such values are relative to an area of 25 cm². Comparisons were made with slides coated exclusively with L-arginine (basal) and non-challenged cultures with sweeteners (negative control).

Biofilm formation

The various microorganisms were grown in the planktonic mode as described above.

Filter paper discs with 80 mm were sterilized in autoclave and kiln-dried. Over the latter, 30 sterile paper discs of antibiogram 0.5 mm (Cefar Diagnóstica Ltda) were laid to cover their periphery, without overlapping the discs. Onto the antibiogram discs, 10 μL of standardized suspensions grown in the presence of sweeteners were dispensed.

This array was inserted into a Paper-Embedded Biofilm Reactor (Selow et al., 2015) (PEBR, Figure 1) under continuous flow of culture media containing the different sweeteners at a flow rate of ca. $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The discs were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and at an atmosphere of N_2 80%, O_2 10%, CO_2 10%, for 72 hours.

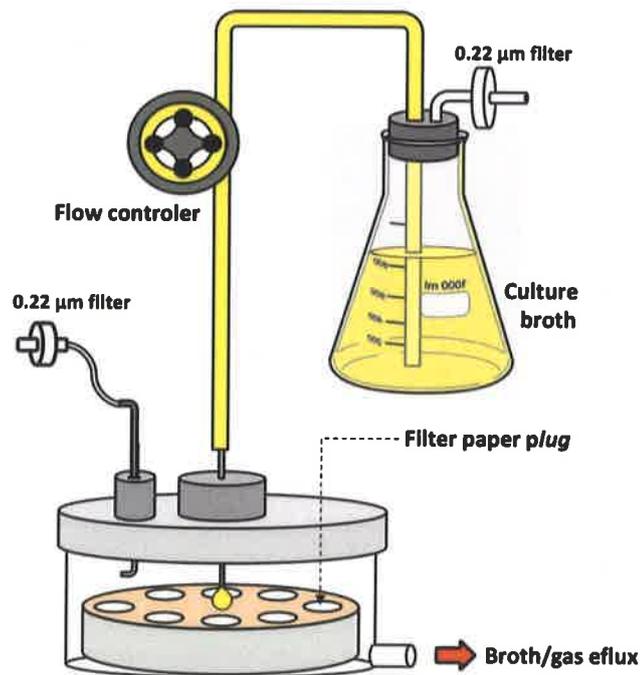


Figure 1. Paper-Embedded Biofilm Reactor (PEBR).

Biofilm proteolytic activity

After the incubations were complete, the systems were disassembled and 10 discs containing biofilms were removed and vertically inserted into 1.5 mL microtubes. The microtubes were filled with 800 μ L solution containing BSA 0.2 mg.mL⁻¹, 10 mM sodium citrate buffer and 10 mM citric acid (pH 5.0), and were incubated at 37 °C for 4 hours at 100 rpm. Following digestion, aliquots of 100 μ L of supernatants were combined with volumes of 100 μ L of Coomassie solution (Brilliant blue G-250 0.025%, ethanol 11.75%, and phosphoric acid 21.25%) on 96-well flat bottom microtiter plates. After 5 minutes, the optical densities of the blends were determined in 540 nm. As controls, repetitions of Coomassie solution with deionized water (*blank*) and repetitions of a BSA/citrate solution with com Coomassie solution (*basal concentration*) were made.

An enzyme unit was arbitrarily determined to be the amount of enzyme capable of promoting digestion of one microgram of BSA per milliliter/minute. Units of proteolytic activity by absorbance of MTT reduction (below) were considered as specific proteolytic activity.

Biofilm hemolytic activity

After the incubations were complete, the systems were disassembled and the plugs were removed; gently washed in sterile water by immersion; and vertically inserted into 24-well tissue culture plate wells. The wells were filled with 3 mL sheep-erythrocyte suspension 1% [in Tris- HCl 10 mM containing NaCl 145 mM (pH 7.5)] and were incubated at 37 °C and stirred at 100 rpm. After 4 hours incubation, the plugs were removed and the suspensions were deposited at 5 °C, for 15 hours. The OD₅₄₀ was measured for supernatants. The negative controls

had equal volumes for both the buffer and the erythrocyte suspension at 5 °C, for 15 h.

A hemolytic unit was arbitrarily defined based on the change in absorbance per minute of incubation at 37 °C. Hemolytic activity units by MTT reduction absorbancies (below) were considered as specific hemolytic activity.

Biofilm metabolic activity

After the incubations were complete and systems were disassembled, 10 further discs were removed and vertically inserted into a 96-well U bottom microplate. The wells were filled with 100 µL de MTT 1 mg.mL⁻¹ at each test well as well as the control well that contained sterile discs without biofilms. No metabolic activator (e.g. D-glutamine or D-glucose) was added. The plates were incubated in the dark, at 37 °C, for 4 hours and 100 rpm. After incubation, the non-reactive MTT was drained by aspiration and 200 µL Isopropyl Alcohol were added. After 5 minutes, 100 µL supernatant were transferred to the 96-well flat bottom microplates and the changes in color were measured in 540 nm.

Statistics

All the tests described above were conducted with at least 30 repetitions. The data were tested as to their distribution normality (*Lilliefors test*) and homogeneity (*Levene test*). Discrepancies were assessed after ANOVA analysis, followed by multiple comparisons (*Tukey HSD test*), a 95% confidence interval and $p < 0.05$. The statistical package SPSS 20.0 (IBM Co.) was employed.

RESULTS AND DISCUSSION

The oral biofilm virulence is influenced by numerous factors. Any substance that is introduced, even for short periods of time, into the microcosm of biofilms can virtually interfere with the expression of virulence factors (Rymovicz, Ronsani, Grégio, Guariza-Filho, Tanaka, & Rosa, 2013; Andrades, Ribas, Rymovicz, Grégio, & Rosa, 2013; Mores, Souza, Cavalca, de Paula e Carvalho, Gursky, Rosa, Samaranyake, & Rosa, 2011; Carvalho, Gursky, Rosa, Rymovicz, Campelo, Grégio, Koga-Ito, Samaranyake, & Rosa, 2010; Carvalho, Gursky, Rosa, Rymovicz, Campelo, Grégio, Koga-Ito, Samaranyake, & Rosa, 2010; Baboni, Barp, Izidoro, Samaranyake, & Rosa, 2009; Ueta, Tanida, Yoneda, Yamamoto, & Osaki, 2001). In this context, the consumption of sugar substitutes appears to be controversial and there is very little information available with regard to microbial virulence modulation.

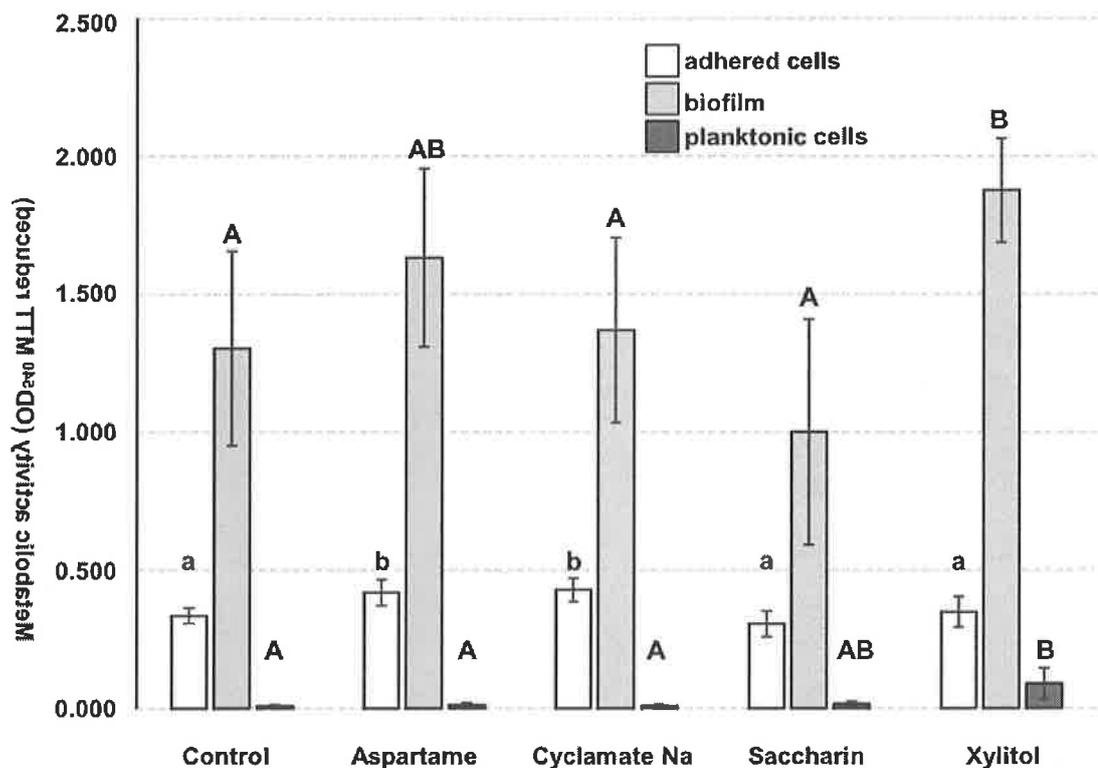


Figure 2. Differential microbial load estimated by the rate of metabolic activity of dynamic biofilms of *S. sanguinis* ATCC®10556™. Different letters on 95% confidence interval bars indicate statistical differences ($p \leq 0.05$) for groups.

Despite its specificities, this study attempted to examine the possibilities of virulence modulation in three common organisms of the oral microbiome (Terefework, Pham, Prosperi, Entius, Errami, Van Spanning, Zaura, Ten Cate, & Crielaard, 2008) that are involved in the disease process either as strict or opportunistic pathogens, or as primary colonizers that precede plaque formation.

The results obtained show that aspartame and cyclamate increase the rate of adhesion of *S. sanguinis* ATCC®10556™ ($p \leq 0.009$) to surfaces coated by acquired pellicle (Figure 2); however, this does not reflect a higher final amount of biofilm when compared to control. The biofilm metabolic activity measure, which is a parameter for estimating its amounts, revealed that two sweeteners did not induce any increase when compared to control ($p \geq 0.081$). On the other hand, xylitol, which had not increased adhesion, had the highest metabolic rate ($p < 0.001$). Following the same behavior, the planktonic culture was more cellularized where xylitol was present ($p < 0.003$).

The finding that xylitol increases *S. sanguinis* biofilm growth contrasts with those from previous studies in which xylitol negatively interfered with biofilm formation (Söderling, & Hietala-Lenkkeri, 2010). Methodological differences may have played a decisive role in such incompatibilities. In the present study, the dynamic biofilm formation system may have prevented metabolic byproduct accumulation that would compromise biofilm formation.

The present study examined the *S. mutans* behavior when it is exposed to a sweetener medium, as sweeteners cannot be metabolized by microorganisms in acid for energy production.

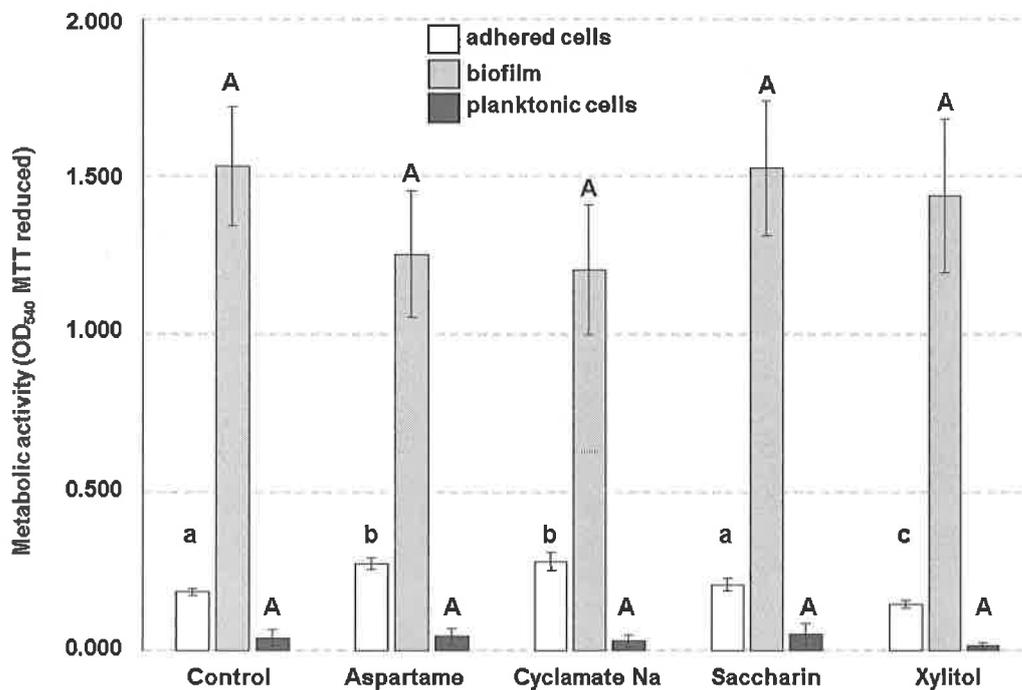


Figure 3. Microbial load estimated by the rate of metabolic activity of dynamic biofilms of *S. mutans* ATCC[®]25175[™]. Different letters on 95% confidence interval bars indicate statistical differences ($p \leq 0.05$) for groups.

Cell adhesion, which is high for aspartame and cyclamate and low for xylitol, did not translate into higher biofilm amounts ($p > 0.056$) (Figure 3). This finding was a cause of concern for us, as other groups have already demonstrated the reducing role of sugar substitutes in populations of cariogenic streptococci (Trahan, 1995; Vadeboncoeur, Trahan, Mouton, & Mayrand, 1983; Söderling, Hirvonen, Karjalainen, Fontana, Catt, & Seppä, 2011; Haghgoo, Afshari, Ghanaat, & Aghazadeh, 2015; Alamoudi, Hanno, Almushayt, Masoud, El Ashiry, & El Derwi, 2014; Giacaman, Campos, Muñoz-Sandoval, & Castro, 2013; Das, Das, Murphy, & Worawongvasu, 1991).¹⁷⁻²³ Once again, it would appear to us that the non-accumulation of excretion products in our dynamic biofilm system is responsible for the contrasts in the results. Nevertheless, the fact that sweeteners do not increase the populations of cariogenic organisms is indeed interesting.

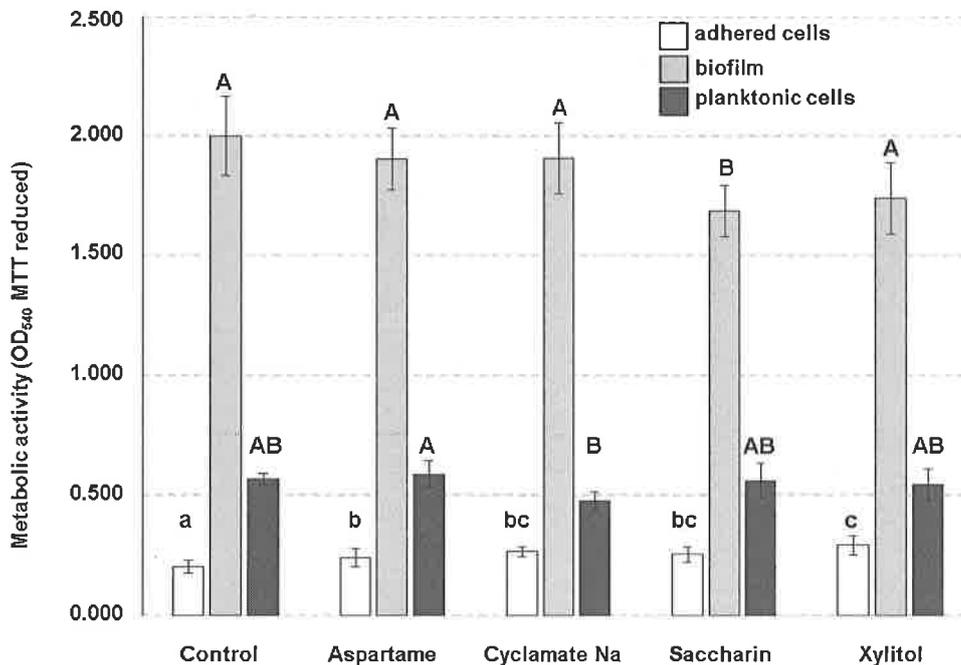


Figure 4. Microbial load estimated by the rate of metabolic activity of dynamic biofilms of *C. albicans* SC5314. Different letters on 95% confidence interval bars indicate statistical differences ($p \leq 0.05$) for groups.

When exposed to aspartame, cyclamate, saccharin and xylitol, *C. albicans* showed increased adhesiveness ($p \leq 0.042$) (Figure 4). However, such increase did not translate into biofilm increase, which was similar (aspartame, cyclamate and xylitol; $p \geq 0.710$) to or even lower (saccharin; $p = 0.045$) than control. The planktonic growth in the presence of sweeteners was similar to that of the control group ($p \geq 0.078$). These findings show that the sugar substitutes would not be expected to engender any increase in the populations of *C. albicans*. This is interesting as diets containing sugars favor fungal growth (Cannon, Holmes, Mason, & Monk, 1995; Pizzo, Giuliana, Milici, & Giangreco, (2000).

With regard to the soluble virulence factors, it was found that none of the substitutes tested increased the secretion of proteases (Figure 5) or hemolysins (Figure 6); cyclamate actually reduced hemolysins secretion ($p = 0.034$) in biofilms. With regard to virulence, such data are appreciable as they show that sweeteners are innocuous to fungal virulence.

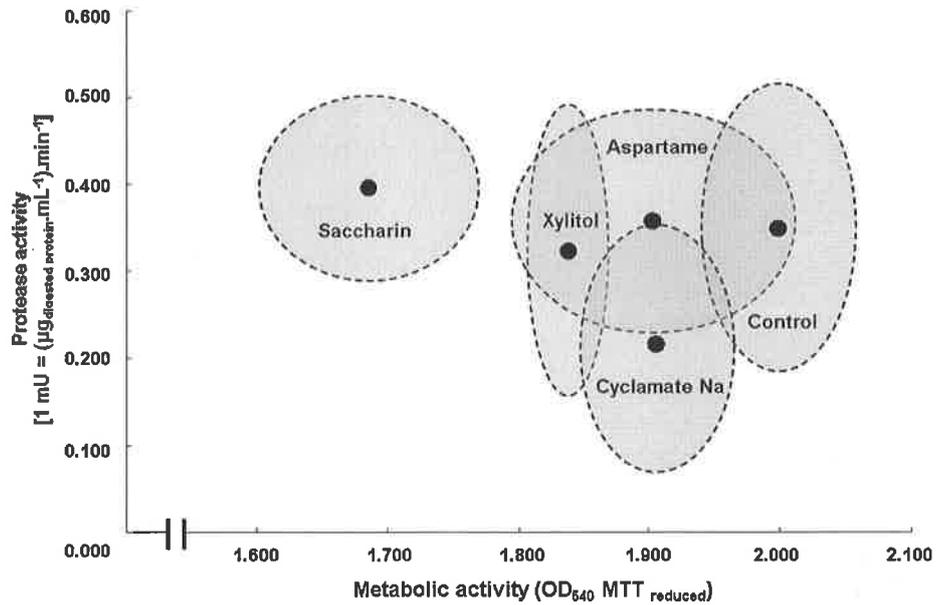


Figure 5. Spatial distribution of biomass mean values estimated from metabolic activity and protease activity of *C. albicans* SC5314. The ellipse horizontal diameters indicate confidence intervals (IC95%) for the biomass measures, whereas vertical diameters indicate IC95% for the proteolytic activity.

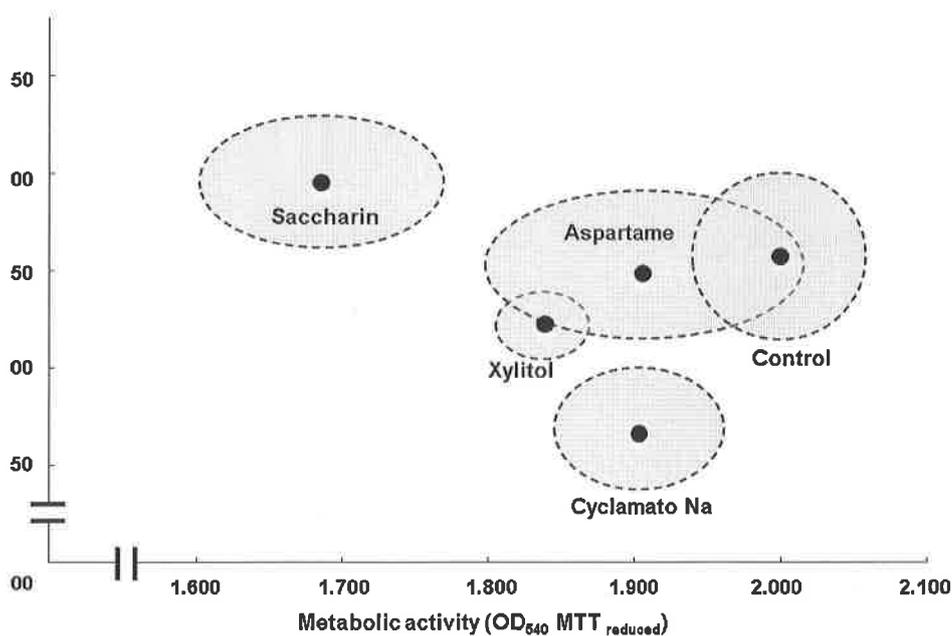


Figure 6. Spatial distribution of biomass mean values estimated from metabolic activity and hemolytic activity of *C. albicans* SC5314. The ellipse horizontal diameters indicate confidence intervals (IC95%) for the biomass measures, whereas vertical diameters indicate IC95% for the proteolytic activity.

The results obtained with dynamic biofilms in this study support the conclusion that the sugar substitutes examined here do not increase the factors of microbial virulence, as opposed to what occurs to other xenobiotics

REFERENCES

1. Person T. Sweeteners Rising. Consumer attention is finally focused on the sweetener revolution. WholeFoods Magazine [Internet]. 2011. Available from: www.wholefoodsmagazine.com/grocery/features/sweeteners-rising.
2. Bandyopadhyay A, Ghoshal S, Mukherjee A. Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug Chem Toxicol*. 2008; 31(4):447-57.
3. Prashant GM, Patil RB, Nagaraj T, Patel VB. The antimicrobial activity of the three commercially available intense sweeteners against common periodontal pathogens: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract*. 2012; 13(6):749-52.
4. Linke HA. Adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces in the presence of artificial sweeteners. *Microbios*. 1983;36(143):41-5.
5. Trahan L, Bourgeau G, Breton R. Emergence of multiple xylitol-resistant (fructose PTS-) mutants from human isolates of mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. *J Dent Res*. 1996;75(11):1892-900.
6. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4692-6.
7. Selow ML, Rymovicz AU, Ribas CR, Saad RS, Rosa RT, Rosa EA. Growing *Candida albicans* biofilms on paper support and dynamic conditions. *Mycopathologia*. 2015;180(1-2):27-33.
8. 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.
9. Andrades KM, Ribas CR, Rymovicz AU, Grégio AM, Rosa EA. Modulation of *Candida albicans* virulence by antirejection immunosuppressant drugs. *Transplantation.* 2013;95(3):e16-8.
 10. Mores AU, Souza RD, Cavalca L, de Paula e Carvalho A, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of secretory aspartyl protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses.* 2011;54(3):195-201.
 11. Carvalho AP, Gursky LC, Rosa RT, Rymovicz AU, Campelo PM, Grégio AM, Koga-Ito CY, Samaranayake LP, Rosa EA. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. *Microb Pathog.* 2010;49(6):315-22.
 12. Baboni FB, Guariza Filho O, Moreno AN, Rosa EA. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(4):427-34.
 13. Baboni FB, Barp D, Izidoro AC, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of *Candida albicans* virulence after exposition to cigarette mainstream smoke. *Mycopathologia.* 2009;168(5):227-35.
 14. Ueta E, Tanida T, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Increase of *Candida* cell virulence by anticancer drugs and irradiation. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(4):243-9.
 15. Terefework Z, Pham CL, Prospero AC, Entius MM, Errami A, van Spanning RJ, Zaura E, Ten Cate JM, Crielaard W. MLPA diagnostics of complex

- microbial communities: relative quantification of bacterial species in oral biofilms. *J Microbiol Methods*. 2008;75(3):558-65.
16. Söderling EM, Hietala-Lenkkeri AM. Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. *Curr Microbiol*. 2010;60(1):25-9.
 17. Trahan L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J*. 1995;45(1 Suppl 1):77-92.
 18. Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, Mayrand D. Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *J Dent Res*. 1983;62(8):882-4.
 19. Söderling E, Hirvonen A, Karjalainen S, Fontana M, Catt D, Seppä L. The effect of xylitol on the composition of the oral flora: a pilot study. *Eur J Dent*. 2011 Jan;5(1):24-31.
 20. Haghgoo R, Afshari E, Ghanaat T, Aghazadeh S. Comparing the efficacy of xylitol-containing and conventional chewing gums in reducing salivary counts of *Streptococcus mutans*: An in vivo study. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(2):112-7.
 21. Alamoudi NM, Hanno AG, Almushayt AS, Masoud MI, El Ashiry EA, El Derwi DA. Early prevention of childhood caries with maternal xylitol consumption. *Saudi Med J*. 2014;35(6):592-7.
 22. 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.
 23. Das S, Das AK, Murphy RA, Worawongvasu R. Aspartame and dental caries in the rat. *Pediatr Dent*. 1991;13(4):217-20.

24. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res. 1995;74(5):1152-61.
25. Pizzo G, Giuliana G, Milici ME, Giangreco R. Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. New Microbiol. 2000;23(1):63-71.