



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉIA CARLA EUGENIO PUPIM

**INFECÇÃO E REPARO TECIDUAL NA CANDIDÍASE  
CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS  
DIABÉTICOS**

---

Londrina  
2016

ANDRÉIA CARLA EUGENIO PUPIM

**INFECÇÃO E REPARO TECIDUAL NA CANDIDÍASE  
CUTÂNEA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS  
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ionice Felipe.  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pupim, Andréia Carla Eugenio.

Infecção e reparo tecidual na candidíase cutânea experimental em camundongos diabéticos / Andréia Carla Eugenio Pupim. - Londrina, 2016.  
67 f. : il.

Orientador: Ionice Felipe.

Coorientador: Eduardo José de Almeida Araújo.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes mellitus - Teses. 2. Candida albicans - Teses. 3. Macrófagos - Teses. 4. Cicatrização - Teses. I. Felipe, Ionice. II. Araújo, Eduardo José de Almeida. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

ANDRÉIA CARLA EUGENIO PUPIM

**INFECÇÃO E REPARO TECIDUAL NA CANDIDÍASE CUTÂNEA  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ionice Felipe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Mario Augusto Ono  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Tacito Graminha Campos  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de março de 2016.

Dedico este trabalho a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste, em especial ao meu esposo Junior Pupim e meus amados filhos Isabella e Gabriel.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Ionice Felipe não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade e confiança em desenvolver esta pesquisa.

Ao meu professor co-orientador Dr. Eduardo José de Almeida Araujo por sua contribuição para a realização das técnicas e desenvolvimento deste.

Ao professor Dr. Tacito Graminha Campos no desenvolvimento deste projeto, dedicação e apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e docentes envolvidos.

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto de pesquisa que proporcionou os resultados desta dissertação.

Aos professores participantes da banca de qualificação professor Dr. Mario Augusto Ono e professor Dr. Fábio Goulart de Andrade por suas contribuições.

Ao Departamento de Histologia e docentes por me apoiarem e permitirem para que eu pudesse fazer este mestrado.

A companheira de trabalho Renata Baldo Rodrigues Carvalho pelo apoio técnico.

Ao professor Dr. Paulo Botura e professor Juliano Oda por suas contribuições.

Aos amigos Beatriz de Souza Lima Nino, Juliana Rubira, Kleber Trugilo e Raquel Arruda por suas contribuições.

A todos que não mencionei aqui, mas que também contribuíram de alguma maneira.

Muito obrigada.

**“Tudo posso naquele que me fortalece.”  
Filipenses 4:13**

PUPIM, Andréia Carla Eugenio. **Infecção e reparo tecidual na candidíase cutânea experimental em camundongos diabéticos**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A incidência de infecções nos pacientes com diabetes *mellitus* é superior quando comparada à população em geral, e a progressão do curso da infecção também é mais complexa. Deficiências na resposta imune são possíveis causas deste aumento no número de infecções. O objetivo deste estudo foi comparar a infecção causada por *Candida albicans* e o reparo tecidual em camundongos diabéticos e não diabéticos. Fêmeas de camundongos BALB/c foram distribuídas em dois grupos: o grupo controle (não diabético) e o grupo com diabetes induzido por administração endovenosa de aloxana. Apenas os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL foram utilizados. Foi inoculado em cada animal  $5 \times 10^6$  de *C. albicans* na forma de pseudohifas em PBS administrados na derme profunda da pata direita traseira. Os grupos foram avaliados após 1, 4, 7, 14 e 21 dias de infecção. Cortes histológicos de pele corados com ácido periódico de Schiff (PAS) foram utilizados para a detecção do fungo e suas formas. Imunohistoquímica para detecção de F4/80 e arginase I foram realizadas para identificação de macrófagos totais e macrófagos M2, respectivamente. Cortes corados com picrossírio sob luz polarizada evidenciaram colágeno tipo I e III. Dosagem de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-13, IL-10 e do fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) foram realizadas por ELISA. Camundongos diabéticos apresentaram predomínio de formas filamentosas do fungo e retardo na eliminação de *C. albicans*. Observou-se significativa redução na densidade de macrófagos F4/80 e atraso na diferenciação para macrófagos M2. Uma vez que a produção de IL-4 foi inferior nos camundongos diabéticos em relação ao controle, é possível que a ativação alternativa para M2 tenha ocorrido por estímulo de IL-13 e TGF- $\beta$ . Em relação ao colágeno, o tipo I reduziu significativamente nos diabéticos em relação ao controle; colágeno tipo III foi possivelmente estimulado pela produção de IL-13 e TGF- $\beta$ . Conclui-se que as condições de diabetes induzido por aloxana desencadearam uma resposta imune alterada com deficiência de IL-4, produção de IL-13 e TGF- $\beta$  tardios e, como consequência, houve um atraso no reparo tecidual. Este estudo contribuiu para a compreensão dos mecanismos envolvidos na candidíase cutânea em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo I.

**Palavras-chave:** Diabetes *mellitus*. *Candida albicans*. Macrófagos. Cicatrização. Citocinas anti-inflamatórias.

PUPIM, Andréia Carla Eugenio. **Infection and tissue repair of experimental cutaneous candidiasis in diabetic mice**. 2016. 67 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

The incidence of infections in patients with diabetes *mellitus* is higher compared to the general population and the progression of the course of infection is also complex. Deficiencies in the immune response are possible causes of this increased in number of infections. The aim of this study was to compare the infection caused by *Candida albicans* and tissue repair between diabetic and nondiabetic mice. Female mice BALB/c were assigned into two groups: the healthy group (non-diabetic) and a group with diabetes induced by intravenous administration of alloxan. Only animals that showed glycemia >250 mg / dL were used. Each animal received  $5 \times 10^6$  of *C. albicans* pseudohyphae in 50  $\mu$ L PBS in the deep dermis of the right hind paw. The groups were assessed after 1, 4, 7, 14 and 21 days of infection. Histological skin sections stained with periodic acid-Schiff (PAS) were used in order to identify *C. albicans* and its forms. Immunohistochemistry for detecting F4 / 80 and arginase I was used to marker total macrophages and M2 macrophages respectively. Sections stained with picosirious under polarized light highlighted collagen type I and type III. The ELISA assay was used to determine the concentration of anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-13, IL-10 and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ). Diabetic mice showed predominance of filamentous form and delay in removing *C. albicans*. There was a significant reduction in the density of macrophage F4 / 80 and delayed differentiation for M2 macrophages. Since IL-4 production was lower in diabetic mice than in controls, it is possible that the alternative activation M2 has occurred by IL-13 and TGF- $\beta$  stimulation. In relation to collagen type I was significantly reduced when compared to non-diabetic mice, collagen type III was stimulated by production of IL-13 and TGF- $\beta$ . It was concluded that the conditions of diabetes induced by alloxan they unleashed an altered immune response showed by an IL-4 deficiency, IL-13 and TGF- $\beta$  production delayed and, as a consequence, was verified a delay in tissue repair. This study aims contributed to the understanding of the mechanisms involved in cutaneous candidiasis in patients with diabetes *mellitus* type I.

**Keywords:** Diabetes *mellitus*. *Candida albicans*. Macrophages. Healing. Anti-inflammatory cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Skin from non-diabetic and diabetic mice infected with <i>C. albicans</i> during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days.....	48
<b>Figura 2</b> Population density of F4/80 and M2 macrophages in non-diabetic and diabetic mice infected with <i>C. albicans</i> during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days .....	49
<b>Figura 3</b> Antiinflammatory cytokines profile of non-diabetic and diabetic mice infected with <i>C. albicans</i> during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days .....	50
<b>Figura 4</b> Collagen profile in skin of non-diabetic and diabetic mice infected with <i>C. albicans</i> during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALS	<i>Agglutinin Like Sequence</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CD	Células dendríticas
Células $\beta$	Células beta
CLRs	Receptores de lectina do tipo C
CMC	Candidíase mucocutânea crônica
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
GAD 65	Anticorpos contra descarboxilase do ácido glutâmico
GLUTs	Proteínas transportadoras de glicose
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HIV-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno leucocitário Humano
HVPCs	Corrente pulsada de alta tensão
IAs	Anticorpos anti-insulina
ICAs	Anticorpos anti-ilhota
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
MBL	Lectina de ligação de manose
MEC	Matriz extracelular
MINCLE	Lectina do tipo C indutível de macrófagos
MMPs	Matriz metaloproteinases

MMR	Receptor de manose de macrófagos
MPO	Mieloperoxidase
NA <sup>+</sup>	Sódio
NLRs	Receptores semelhantes a NOD
NO	Óxido Nítrico
OH	Radical Hidroxila
OPC	Candidíase orofaríngea
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PRRs-	Receptores de reconhecimento de padrões moleculares
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAPS	Aspartato proteases secretadas
SGLTs	Transportadores de glicose ligado ao sódio
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TGF-β1	Fator de transformação de crescimento beta 1
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th17	Linfócito T auxiliar 17
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TLRs	Receptores semelhantes à Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	DIABETES <i>MELLITUS</i> DO TIPO 1 .....	16
2.2	MODELO DE CAMUNDONGOS COM DIABETES INDUZIDO POR ALOXANA .....	17
2.3	<i>Candida albicans</i> E FATORES DE VIRULÊNCIA .....	19
2.4	CANDIDIASE MUCOCUTÂNEA E RESPOSTA IMUNE .....	23
2.5	MACRÓFAGOS E CICATRIZAÇÃO .....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	31
3.1	GERAL .....	31
3.1.1	Específicos .....	31
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>5</b>	<b>ARTIGO - Infection and tissue repair of experimental cutaneous candidiasis in diabetic mice - Medical Microbiology and Immunology - ISSN: 0300-8584 (print version), ISSN: 1432-1831 (electronic version). Impact factor 3.038. Qualis A2 – Medicina II</b> .....	39
	<b>Abstract</b> .....	39
	<b>Introduction</b> .....	40
	<b>Materials and Methods</b> .....	40
	Ethical Approval .....	40
	Mice and Induction of Diabetes .....	40
	<i>Candida albicans</i> Culture .....	41
	<i>Cutaneous C. albicans</i> Infection and Fungal Load .....	41
	Periodic Acid-Schiff Staining of Yeast and Filamentous Forms of <i>Candida</i> .....	41
	Immunohistochemistry .....	41
	Quantification of Collagen .....	42
	Cytokines Analysis .....	42
	Statistical Analysis .....	42
	<b>Results</b> .....	42

<b>Discussion</b> .....	44
<b>References</b> .....	45
<b>Figures</b> .....	48
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>ANEXOS</b> .....	53
ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA .....	54
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO – MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMUNOLOGY...55	
ANEXO C – NSTRUCTIONS FOR AUTHORS .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por *C. albicans* (*C. albicans*) são mais frequentes na população diabética, sobretudo nos casos em que há descontrole metabólico. Isso pode ocorrer tanto na fase inicial da doença ou pode surgir em qualquer tempo após o diagnóstico (OLIVEIRA; MILECH, 2006). Deficiência na resposta imune são possíveis causas deste aumento no número de infecções. Além disso, alguns micro-organismos tornam-se mais virulentos num ambiente com alto teor de glicose, como ocorre com *C. albicans*. Outro mecanismo possivelmente envolvido no aumento do número de infecções, seria o aumento da adesão de micro-organismos as células diabéticas quando comparado com células não diabéticas, como descrito para infecções causadas por *C. albicans* (TEKELI *et al.*, 2004).

Diabetes *mellitus* (DM) e hiperglicemia estão associados a uma resposta imune inata deficiente que compromete a função de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, e que pode ter efeitos diferentes e, por vezes, graves nos tecidos. Os pacientes com descontrole glicêmico são particularmente mais propensos a infecções graves e/ou recorrentes (ARSLAN *et al.*, 2016).

Lesões cutâneas são eventos comuns nos diabéticos, sendo necessário restabelecer a integridade física da pele rapidamente, a fim de manter a homeostase e prevenir infecções e sépsis. Feridas agudas não apresentam problemas na cicatrização na população em geral, mas nos indivíduos com DM, com o progresso da doença, as feridas tornam-se comprometidas pela má circulação sanguínea. Portanto, no DM, o reparo de feridas é mais lento, podendo resultar em lesões crônicas e difíceis de curar (BECKER; THRASIVOULOU; PHILLIPS, 2012).

Frequentemente, os pacientes diabéticos têm comprometimento da barreira epidérmica, incluindo a cicatrização incompleta de feridas, o que facilita a invasão e a disseminação de patógenos. Isso ocorre por consequência da associação entre o alto nível de glicose e deficiências na resposta imune. O desenvolvimento de um modelo experimental de candidíase cutânea em camundongos BALB/c imunocompetentes foi objeto de estudos prévios do nosso grupo de pesquisa. Os resultados demonstraram equilíbrio entre a secreção de

citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, causando assim a eliminação de *C. albicans* (CAMPOIS *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi comparar o processo de infecção por *C. albicans* e o reparo tecidual entre camundongos diabéticos e não diabéticos. Buscamos entender melhor o quanto o DM interfere no recrutamento e na ativação alternativa de macrófagos na resposta imune contra fungos do gênero *Candida*. Além da resposta imune, avaliamos a cicatrização do tecido cutâneo lesionado, com o intuito de compreender os mecanismos de reparo tecidual alterados pelo descontrole glicêmico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O DM é uma das principais doenças crônico-degenerativas da atualidade. É caracterizado por uma deficiência absoluta de insulina, classificado como DM tipo 1 (DM1); ou pela resistência à insulina, classificado como DM tipo 2 (DM2). A deficiência de insulina influencia negativamente o metabolismo dos glicídios, proteínas, lipídios, água, vitaminas e minerais (DORADO, 2008; SIMPSON *et al.*, 2010). Na deficiência ou ausência de insulina, a glicose se acumula na corrente sanguínea causando complicações que, ao longo do tempo, podem causar disfunção e falha de vários órgãos, como olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos e coração, podendo levar ao óbito (OLIVEIRA; MILECH, 2006; KING; BOWE, 2015).

É uma doença de alta prevalência e um importante problema de saúde pública. Segundo a *International Diabetes Federation* (2015), 387 milhões de pessoas em todo o mundo estão afetadas pelo DM. Este número pode ser muito maior, pois se estima que pessoas com DM não diagnosticado somam 179 milhões. A previsão é que o número de pacientes diabéticos deve aumentar para 592 milhões até o ano de 2035. Atualmente, a maior parte dos diabéticos (77%) vive em países em desenvolvimento. Sugere-se que o aumento na incidência de DM seja devido ao estilo de vida, ao envelhecimento da população e a mudanças ambientais. As pessoas mais acometidas estão entre 40 e 59 anos de idade, podendo ocorrer em todas as faixas etárias. As crianças que desenvolveram DM1 em 2013 somam mais de 79 milhões e cerca de 21 milhões recém-nascidos vivos foram afetados pelo DM durante a gravidez (COSTA; VIEIRA, 2015).

### 2.1 DIABETES MELLITUS DO TIPO 1

O DM1 pode ser classificado em duas formas clínicas quanto à sua origem: o tipo 1 imunomediado e o tipo 1 idiopático. O tipo 1 imunomediado apresenta infiltrado de linfócitos T nas ilhotas no início da doença, tem associação com sistema de antígenos leucocitários humano (HLA), apresenta marcadores de destruição imunológica das células como anticorpos anti-ilhota (ICAs), anticorpos anti-insulina (IAAs), anticorpos contra descarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), anticorpos contra tirosino fosfatase IA-2 e IA 2 $\beta$  e associação com outras doenças autoimunes. Os imunomediados representam 90% de todos os pacientes com DM1.

Os 10% restantes com etiologia desconhecida (idiopáticos) apresentam insulinoopenia permanente com tendência para cetoacidose, não havendo evidências de autoimunidade. A maioria dos indivíduos com DM1 idiopático são de origem asiática ou africana (EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003; KNIP; SILJANDER, 2008; PABLO; DORADO, 2008).

## 2.2 MODELO DE CAMUNDONGOS COM DIABETES INDUZIDO POR ALOXANA

Em 1838, Friedrich Wohler e Justus Liebig *apud* Lenzen (1988) sintetizaram novas substâncias, quimicamente relacionadas com ácido úrico, como a aloxana (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil). Em 1937, Jacobs relatou que injeções de aloxana em animais produziam uma hiperglicemia transitória seguida também por hipoglicemia transitória, o que foi atribuído ao dano hepático. Em 1943, as propriedades desta droga diabetogênica foram relatadas por Dunn, Sheehan e McLethie através da sua administração em coelhos, que demonstrou necrose específica de ilhotas pancreáticas. Desde então, a aloxana tem sido utilizada em modelos experimentais de DM1 (SZKUDELSKI, 2001; MCLETCHIE, 2002).

Para este modelo em camundongos, é importante conhecer o mecanismo de ação da glicose. É uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática e seu transporte é realizado através de difusão facilitada a favor de seu gradiente de concentração, com participação de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) na superfície de todas as células. Além disso, em células epiteliais, ocorre absorção e reabsorção através de um processo de transporte acoplado ao íon sódio ( $\text{Na}^+$ ), o qual promove um transporte contra o gradiente de concentração de glicose e a favor do gradiente de concentração de  $\text{Na}^+$ , através de proteínas transportadoras de glicose ligadas ao sódio (SGLTs). Nestas células, a glicose concentrada intracelularmente difunde-se para o meio extracelular por difusão facilitada através de GLUTs presentes na membrana basolateral (MACHADO, 1998; RAJA; KINNE, 2015; ZANOLI *et al.*, 2015).

Para a manutenção da glicemia, é necessária a ação da insulina, um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células beta (células  $\beta$ ) das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes

de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (diminuição da via da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos musculares e no tecido adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; KING; BOWE, 2016).

A secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática em resposta à glicose depende do metabolismo intracelular desse substrato. A célula  $\beta$  pancreática expressa a isoforma GLUT2 de transportador de glicose, cuja alta capacidade de transporte permite que as elevações de glicose plasmática se reflitam em variações paralelas na concentração intracelular da glicose, garantindo assim uma resposta secretória proporcional às variações plasmáticas (MACHADO, 1998; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006;). A perda de capacidade secretória da insulina ocorre principalmente em resposta à glicose, e redução na expressão do GLUT2 nas ilhotas pancreáticas de diabéticos, levando ao desenvolvimento do DM1 (REDDY *et al.*, 1998).

Aloxana é um dos produtos químicos diabetogênicos mais utilizados na investigação do diabetes, por ser um análogo citotóxico da glicose. Embora sua citotoxicidade ocorra por meio de diferentes vias, seu mecanismo de ação está restrito às células  $\beta$ , através da geração de radicais hidroxila (OH) altamente reativos causando a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (LENZEN, 2008). Animais com DM induzido por aloxana têm sido utilizados como modelos experimentais de DM1 (GE *et al.*, 2009).

A aloxana na presença de tióis intracelulares, especialmente glutathiona, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) em uma reação redox cíclica com seu produto de redução, o ácido dialúrico. A auto-oxidação do ácido dialúrico gera radicais superóxido, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, em uma etapa final de reação catalisada pelo ferro, gera também radicais OH. Estes OH são responsáveis pela morte das células  $\beta$  pancreáticas, que têm uma capacidade de defesa antioxidante particularmente baixa. Como um reagente de tiol, aloxana também inibe seletivamente a secreção de insulina induzida pela glicose através da sua capacidade de inibir o sensor de glicose das células  $\beta$  (LENZEN, 2008).

A aloxana exerce ação diabetogênica quando é administrada via

parenteral: intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose requerida para a indução do DM depende da espécie animal, da via de administração e do estado nutricional (SZKUDELSKI, 2001; DORNAS *et al.*, 2006;). As doses variam de 50 a 200 mg/kg em ratos e de 40 a 200 mg/kg em camundongos (KING; BOWE, 2016).

### 2.3 *Candida albicans* E FATORES DE VIRULÊNCIA

O gênero *Candida* apresenta mais de 150 espécies, das quais 10 são responsáveis por infecções em seres humanos (SUÁREZ *et al.*, 2013). É um fungo que frequentemente coloniza a pele e as superfícies mucosas de indivíduos, na forma comensal. No entanto, quando os mecanismos de defesa do hospedeiro estão prejudicados, como ocorre em pacientes diabéticos, *C. albicans* pode tornar-se um agente patogênico. Portanto, infecções superficiais da pele, mucosa oral e vaginal podem ocorrer, assim como infecções sistêmicas mais graves, as quais são associadas com um alto grau de morbidade e mortalidade (NETEA *et al.*, 2008; TSCHERNER *et al.*, 2015). A patogenicidade fúngica depende do estado imunológico do hospedeiro. Sinais e sintomas da infecção surgem principalmente em indivíduos imunocomprometidos. No entanto, *C. albicans* também pode causar doenças em indivíduos imunocompetentes (SPARBER; LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2015).

A manifestação clínica das infecções causadas por *C. albicans* é denominada de candidíase (BACHMANN *et al.*, 2002). A causa mais frequente das duas formas mais comuns de doença mucocutânea se deve à presença de *C. albicans*: candidíase oral e vaginal. Candidíase oral aflige uma variedade de pacientes, incluindo usuários de prótese total e aqueles com Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS). A candidíase vaginal afeta cerca de três quartos da população feminina pelo menos uma vez na vida (COTA; HOYER, 2015).

A capacidade que *C. albican* em causar infecção no hospedeiro são atribuídas às suas propriedades de virulência, que incluem aderência, dimorfismo, interferência no sistema imune, sinergismo, a produção de matriz extracelular e enzimas, tais como as proteinases e lipases (WILLIS *et al.*, 2001).

O processo inicial de invasão de *C. albicans* depende da sua capacidade de aderir às células do hospedeiro. Adesão é fundamental para que o fungo sobreviva aderido ou internalizado pelas células epiteliais. *C. albicans* tem

várias famílias de genes que codificam as proteínas envolvidas na patogênese. Entre elas está a *Agglutinin Like Sequence* (ALS), família que codifica as glicoproteínas da parede celular. Algumas proteínas ALS atuam na adesão da superfície do fungo a componentes celulares do hospedeiro (ZHAO *et al.*, 2004).

As proteínas ALS não estão distribuídas de maneira uniforme sobre a superfície celular de *C. albicans*. Por exemplo, ALS1 é encontrada na superfície das células de levedura, exceto nas cicatrizes celulares quando células filhas são formadas. Da mesma forma, ALS1, ALS2 e ALS4 estão agrupados na junção entre a levedura mãe e o tubo germinativo quando as células são cultivadas sob condições que promovem a formação de hifas (COTA; HOYER, 2015).

Os fungos são um grupo altamente bem sucedido e diversificado de micro-organismos. Eles apresentam dois modos proeminentes de proliferação: 1) a forma de levedura, em que as células apresentam-se discretamente alongadas ou células filhas que tipicamente desassociam da célula mãe; e 2) a forma de hifas, em que o crescimento contínuo de uma ponta conduz a um tubo alongado em que as células separadas são geralmente delineadas por septos (WHITEWAY; BACHEWICH, 2007). Essa capacidade que *C. albicans* tem de se diferenciar da forma unicelular (levedura) para a forma filamentosa (hifas ou pseudo-hifas) deve-se ao dimorfismo (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

Normalmente uma levedura comensal de *C. albicans* invade o hospedeiro humano através de duas etapas: 1) a adesão epitelial predominantemente pela forma de levedura e, 2) a penetração epitelial por formas filamentosas de crescimento (pseudo-hifas e hifas), com posterior disseminação e infecção de órgãos internos (WU *et al.*, 2013).

A forma de levedura é identificada como forma de disseminação no ambiente e desempenha um papel crítico nas fases iniciais da progressão da doença. As formas filamentosas exercem a patogenicidade adicional através da adaptação a diferentes condições ambientais (SAITO *et al.*, 2013).

A transição de levedura para forma filamentosa é desencadeada em resposta a vários sinais, como temperatura (37°C), presença de soro (*in vitro*), a concentração de CO<sub>2</sub>, pH neutro ou alcalino, limitação de nutrientes e presença de aminoácidos (SATO *et al.*, 2004; ROMÁN *et al.*, 2007; SHAPIRO *et al.*, 2012; VEDIYAPPAN *et al.*, 2013; MOTAUNG *et al.*, 2015).

As formas filamentosas de *C. albicans* abrangem duas morfologias diferentes: pseudohifas e hifas. Nas pseudohifas, as células estão ligadas no final, e cada célula tem uma forma elíptica com constrições nos septos. Na hifas verdadeiras, estas constrições estão ausentes e uma linha de células mostram uma largura relativamente uniforme (KADOSH; JOHNSON, 2005). As hifas de *C. albicans* tem as mesmas propriedades de outras hifas de fungos, tais como, a capacidade de exercer uma força mecânica, facilitar a penetração da superfície do epitélio e danificar as células endoteliais, características do fator de virulência das hifas (WIBAWA; PRASENO; AMAN, 2015).

A transição de leveduras para hifas é um dos fatores de virulência, que também tem sido sugerida para o desencadeamento de respostas imune do tipo linfócitos T auxiliar 17 (Th17), permitindo assim a discriminação entre *C. albicans* como comensais e invasivas (GOW *et al.*, 2012).

Além disso, as hifas têm maior capacidade de adesão, invasão e destruição nos tecidos do hospedeiro do que a forma de levedura (CASANOVA *et al.*, 1992). Essa transição a partir da forma de levedura para a forma de hifas contribui para a evasão dos macrófagos, invasão de tecidos e formação de biofilmes (VEDIYAPPAN *et al.*, 2013).

No estrato córneo da pele, levedura de *C. albicans* é a morfologia predominante, porém, quando se torna patogênica, predomina a forma de pseudohifas na derme e órgãos sistêmicos (GOW *et al.*, 2012).

A morfologia também influencia outros fatores de virulência, como a adesão e formação de biofilmes. Além disso, células de levedura são mais facilmente disseminadas na corrente sanguínea, enquanto que hifas permitem a penetração no tecido hospedeiro para acessar fontes de nutrientes. Esta mudança de crescimento para hifas, também confere para a evasão de *C. albicans* dos fagossomas (HEINTZ-BUSCHART *et al.*, 2013).

A formação de biofilme envolve vários aspectos fenotípicos, como a adesão, a reestruturação da superfície da célula, o dimorfismo de levedura-hifas e a produção de material da matriz extracelular de proteção e enzimas como as proteinases (VERMA-GAUR *et al.*, 2015).

As proteinases aspartato proteases secretadas (SAPs) de *C. albicans* desempenham um papel importante na patogenicidade deste fungo. Eles constituem uma família de pelo menos dez membros com subfamílias. Várias linhas

de evidência sugeriram que a expressão de SAPs permitem ao fungo aderir e/ou invadir os tecidos do hospedeiro e causar danos, dos quais o mais importante é causar desvios na imunidade do hospedeiro, não exacerbando a resposta imune (PERICOLINI *et al.*, 2015).

As funções propostas para estas proteinases durante a infecção incluem a digestão de proteínas do hospedeiro para o fornecimento de nutrientes, a evasão de defesas do hospedeiro degradando imunoglobulinas e proteínas do complemento, a aderência e a degradação das barreiras do hospedeiro durante a invasão (CHEN *et al.*, 2002). Com a expressão regulada de diferentes proteases e especificidades diferentes, destinadas à vários receptores do hospedeiro, fungos invasivos podem atingir versatilidade para atacar uma variedade de tecidos (WU *et al.*, 2013).

Muitos modelos experimentais de animais de infecção por *C. albicans* demonstram e indentificam a expressão diferencial de genes da família das SAPs. Schaller *et al.* (1998, 2000) demonstraram a presença de genes SAPs em modelos de candidíase oral e cutânea *in vitro* e sugeriram que praticamente todos os genes de proteinases estavam expressos nestes modelos.

A expressão de SAPs1-6 foi confirmada por meio de microscopia imunoeletrônica, demonstrado a expressão predominante de SAPs1-3 no interior da parede celular de todas as células de levedura e hifas, e SAPs4-6 foram encontradas principalmente nas hifas. As SAPs4-6 são importantes para a invasão de tecidos, e indicado por diferentes padrões de expressão de genes de SAPs em vários modelos de infecção (SCHALLER *et al.*, 1999, 2005). Foi demonstrada a expressão de SAPs1 e SAPs2 em vaginite experimental em ratos (DE BERNARDIS *et al.*, 1995).

Wu *et al.* (2013) demonstraram que as SAPs4-6 de *C. albicans* causam apoptose das células epiteliais, e queratinócitos. Elas se ligam às integrinas da superfície celular, que conduzem à internalização, exercendo suas atividades no meio ácido de lisossomas para desencadear a apoptose das células, podendo ser descrito como um mecanismo “Cavalo de Tróia”. Células epiteliais nas mucosas contém integrinas na sua membrana externa, que são os primeiro alvos para a invasão por *C. albicans*. As SAPs auxiliam na invasão das células do hospedeiro através da criação de lacunas na superfície da mucosa que facilita a penetração do agente patogênico.

## 2.4 CANDIDÍASE MUCOCUTÂNEA E RESPOSTA IMUNE

Candidíase mucocutânea crônica (CMC) refere-se a um grupo heterogêneo de doenças que são caracterizadas por infecções recorrentes ou persistentes. São exemplos de CMC a candidíase orofaríngea (OPC) que envolve a boca, faringe e esôfago; a candidíase cutânea ou por via dérmica envolvendo a pele; e candidíase vaginal que envolve a mucosa genital feminina (DEPNER *et al.*, 2015).

O maior causador de candidíase nos seres humanos é *C. albicans*, que pode provocar desde uma infecção superficial até um quadro mais invasivo (sistêmica). Os sinais e sintomas variam de acordo com a área infectada, podendo surgir pequenas complicações ou até situações que comprometem a vida do paciente (MUHAMMAD *et al.*, 2015).

As lesões características, encontradas nos portadores de candidíase, são placas esbranquiçadas, com crostas e úlceras, normalmente encontradas na boca e faringe, trato gastrointestinal e mucosa vaginal. Os pacientes com CMC podem tanto progredir para recorrência como para a cronicidade da doença (CHAMBÔ FILHO *et al.*, 2014).

Em quase todos os casos de CMC, há uma associação com outras doenças, tais como distúrbios dérmicos, doenças do aparelho digestivo, poliendocrinopatias, neoplasias malignas e principalmente com doenças auto-imunes (KIRKPATRICK, 1994). Análises imunológicas mostraram que CMC e seus distúrbios associados são causados por uma imunodeficiência celular mediada, como, um defeito central ou incapacidade de desenvolver e expressar respostas imunes mediadas por células, que são eficazes contra a *Candida* (NAGASHIMA *et al.*, 2000).

Para compreender a resposta contra *C. albicans*, é necessário caracterizar os dois tipos de resposta imune, a imunidade inata e adquirida. O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos e é mediada pelos fagócitos, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (CD). A imunidade adquirida está envolvida na eliminação de agentes patogênicos na fase tardia de infecção e também na geração de memória imunológica (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Em indivíduos imunologicamente competentes, o sistema imunológico inato funciona como uma sentinela eficiente que fornece proteção

contra as milhares de espécies de fungos com os quais os seres humanos tem contato regularmente (NETEA *et al.*, 2008) .

A levedura oportunista de *C. albicans* não causa doença em indivíduos imunocompetentes, apesar de habitar superfícies corporais, sendo controlada por mecanismos imunes, especificamente as células Th17 e citocinas produzidas por elas. As infecções de mucosas por espécies de *Candida* indicam a deficiência de células T, frequentemente encontrada em indivíduos imunossuprimidos (ZHENG *et al.*, 2015).

A CMC ocorre na ausência de fontes inatas de interleucina (IL) 17 (IL-17) e IL-22, e também na resposta ineficaz de linfócitos Th17, causadas por deficiência na imunidade como AIDS ou Síndrome de hiper IgE (HERNÁNDEZ-SANTOS *et al.*, 2013; MCDONALD, 2012). Pode também estar associada com mutações no receptor de lectina do tipo C de reconhecimento fúngico e suas moléculas de sinalização ou o ligante de Dectina-1(KASHEM *et al.*, 2015).

O sistema imune inato reconhece diferentes estruturas moleculares características de vários patógenos microbianos. Estas substâncias microbianas capazes de estimular a imunidade inata são denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Diferentes classes de microrganismo expressam diferentes PAMPs, como ácidos nucleicos de vírus, proteínas (flagelina) e lipídios de parede celular como o lipopolissacarídeo (LPS) encontradas em algumas espécies de bactérias gram negativa e carboidratos (mananas e glucanas/dectinas) de fungos, entre outros (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Para o reconhecimento de PAMPs, o sistema imune inato utiliza uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) que podem ser expressos na superfície da célula, em compartimentos intracelulares, ou segregadas para os fluidos na corrente sanguínea e nos tecidos. As principais funções destes PRRs incluem a opsonização, a ativação do sistema complemento e cascata de coagulação, a fagocitose, a ativação das vias de sinalização pró-inflamatórias, e podem também induzir a apoptose (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

As respostas imunes são estimuladas tanto por componentes da camada exterior, como da camada interior da parede da célula de *C. albicans*, sendo que o reconhecimento e indução de resposta imune mediante a presença deste fungo, pode ocorrer por diferentes classes de PRRs, como os receptores semelhantes a Toll (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs) e os receptores

semelhantes a NOD (NLRs), capazes de reconhecer e induzir uma resposta imune inata a diferentes PAMPS (GOW *et al.*, 2011).

Os membros da família TLRs são capazes de reconhecer coletivamente estruturas de lipídios, carboidratos, peptídeos e ácido nucleico que são amplamente expressas pelos diferentes grupos de micro-organismos (BLASIUS; BEUTLER, 2010). Eles são expressos em várias células do sistema imune, incluindo os macrófagos, as CD, células B, tipos específicos de células T, e mesmo em células não imunes, tais como fibroblastos e células epiteliais. Alguns TLRs são expressos na superfície da célula (TLRs 1, 2, 4, 5, e 6), ao passo que outros são expressos na membrana das vesículas de endocitose ou outras organelas intracelulares (TLRs 3, 7, 8, e 9) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; TRINCHIERI; SHER, 2007).

PAMPs polissacarídeos como as mananas de parede celular de *Candida* são reconhecidos por receptores de manose e TLR4, as fosfolipomananas são reconhecidas por TLR2 e também colaboram com o receptor  $\beta$ -glucano de dectina-1 para a estimulação da produção de citocinas. O reconhecimento de ligações 1,3-beta-glucanos por dectina-1 mostra ser uma das principais vias de reconhecimento de fungos. Dectina-1 amplifica TLR2 e a produção de citocinas induzida por TLR4 em células de murinos e humanos, o que resulta na produção de citocinas tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (FERWERDA *et al.*, 2009).

Os CLR's reconhecem principalmente estruturas polissarídeas de microorganismos e são, provavelmente, a família de PRRs mais importante no reconhecimento de fungos. *C. albicans* é reconhecida por vários CLR's que incluem, dectina-1, dectina-2, o receptor de manose de macrófagos (MMR), *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) dendrítica, a lectina do tipo C indutível de macrófagos (Mincle), e a lectina de ligação a manose em circulação (MBL) (GOW *et al.*, 2012).

As respostas imune do tipo linfócito T auxiliar 1 (Th1) e do tipo linfócito T auxiliar 2 (Th2) são fatores importante que garante a susceptibilidade ou resistência a infecção por *C. albicans*. Na colonização da mucosa e infecção sistêmica de camundongos por fungo, a resposta imune é do tipo Th1 e a proteção é dependente de fagócitos, principais mediadores da imunidade adquirida, com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 relacionada com resistência à *Candida*. Mas a resposta

tipo Th2 com secreção de citocinas inibidoras IL-4, IL-5 e IL-10, promovem a progressão da doença (D'OSTIANI *et al.*, 2000; ELAHI *et al.*, 2000; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010) e com susceptibilidade a este fungo (ROMANI, 2011; VAN DER GRAAF *et al.*, 2005).

As células do sistema imune que funcionam como a primeira linha de defesa são neutrófilos polimorfonucleares (PMN), monócitos/macrófagos e CD, conhecidos como fagócitos profissionais. Os PMNs são as principais células que respondem durante infecções por *C. albicans*, os monócitos se diferenciam em macrófagos ou CD, sendo que as CD são as células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais com função central, intermediando a imunidade inata e a adaptativa (MIRAMÓN; KASPER; HUBE, 2013).

PMN são as células predominantes na fase inicial de infecção por *C. albicans* encontradas nos microabcessos, rodeados por um pequeno número de células mononucleares. A medida que o fungo vai sendo eliminado, as células predominantes são os macrófagos, que aderem ao colágeno de matriz extracelular e tem capacidade superior de matar leveduras de *C. albicans* enquanto as hifas inibem a fusão do fagolisossoma evitando sua morte (NEWMAN *et al.*, 2005).

*C. albicans* é resistente à atividade fungicida de macrófagos, incluindo ROS e RNS, através da codificação de uma catalase a superóxido dismutase (SOD), enzimas SOD (SOD 4-6) são secretadas e desintoxicam ROS extracelulares produzidas por macrófagos. Assim, *C. albicans* escapa da explosão respiratória antimicrobiana antes que possa causar dano intracelular (JIMÉNEZ-LÓPEZ; LORENZ, 2013).

Os macrófagos atuam em resposta a diferentes citocinas e também ao ambiente que estão expostos, podendo inibir a proliferação (matar agentes patogênicos) ou promover a proliferação (reparação de feridas). Eles possuem a capacidade de metabolizar arginina, resultando em óxido nítrico (NO) indicando uma resposta inflamatória ou ornitina para uma resposta de reparação (MILLS, 2015).

## 2.5 MACRÓFAGOS E CICATRIZAÇÃO

Macrófagos com fenótipos e funções específicas estão presentes em diferentes fases de reparação e contribuem para os processos e transições dentro do programa de reparação de ferida, como a remoção de resíduos necróticos, a

capacidade de induzir apoptose e a fagocitose de neutrófilos, contribuindo para a resolução da fase inflamatória e a transição para a fase proliferativa de cura (NOVAK; KOH, 2013).

A ativação específica de macrófagos varia ao longo da fase pró-inflamatória, predominando macrófagos classicamente ativados (M1), e posteriormente, pró-reparadora de macrófagos alternativamente ativados (M2). Os M1 observados durante a resposta aguda ao trauma liberam altos níveis de ROS, fagocitam e liberam citocinas pró-inflamatórias, para remover o patógeno e detritos da ferida no local da lesão. Os M2 participam da reparação de tecidos, com a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e menor produção de ROS. Eles também secretam citocinas imunossupressoras, como a IL-10. Esses mediadores permitem que M2 sintonizem as respostas inflamatórias, fagocitando detritos e promovendo remodelação e reparação tecidual (GENSEL; ZHANG, 2015).

A ativação alternativa de macrófagos ocorre por citocinas IL-4 e IL-13, produzidas na ativação de células Th2, particularmente em respostas alérgicas, e parasitas patogênicos e extracelulares. Os efeitos destas citocinas nos macrófagos, em conjunto com os efeitos da IL-10, atuam na desativação da resposta imune, diferente da ativação clássica por interferon gama (IFN- $\gamma$ ). As citocinas IL-4 e IL-13 regulam positivamente a expressão do receptor de manose e moléculas MHC de classe II por macrófagos, o qual estimula a endocitose e a apresentação de antígeno, e induz a expressão das quimiocinas seletivas e enzimas intracelulares, como a arginase, que estão implicadas no recrutamento de células e formação de granulomas (GORDON, 2003).

A expressão da enzima arginase por M2 tem sido apontada como papel central na reparação dos tecidos. Arginases catalisam a degradação de arginina em ureia e ornitina. A ornitina pode, por sua vez, ser metabolizada em prolina, um aminoácido que é abundante em colágenos (BRANCATO; ALBINA, 2011).

No DM dificuldade na cicatrização de feridas é uma complicação comum e uma grande morbidade, resultando em dor, com qualidade de vida diminuída (BECKER; THRASIVOULOU; PHILLIPS, 2012). As pessoas com diabetes não apresentam a barreira da epiderme íntegra, na qual fica comprometida a cicatrização de feridas (KOIVUKANGAS *et al.*, 1999), desta forma facilita a penetração e disseminação fúngica.

As feridas diabéticas são caracterizadas por angiogênese prejudicada, oclusão de vasos sanguíneos dentro da ferida e diminuição da produção de colágeno, sendo que a má cicatrização de feridas, dentro destas várias causas, são os fatores de crescimento defeituosos que mais contribuem para o retardo no reparo do tecido danificado. Kim *et al.* (2014) mostraram que a cicatrização de feridas retardada observada em ratos diabéticos foi associada com um aumento significativo dos níveis de glicose no sangue; além disso, quando comparados com o grupo diabéticos com controles normais, foram observadas diferenças significativas na cicatrização de feridas (KIM; CHO; LEE, 2014).

A cicatrização de feridas é dividida em três etapas:

- (i) Fase inflamatória inicial;
- (ii) Fase proliferativa;
- (iii) Fase final ou remodelamento.

A fase inflamatória aguda ocorre imediatamente após o dano ao tecido caracterizada pela presença de infiltrado neutrófilico, posteriormente substituído por células mononucleares. A fase proliferativa é caracterizada pela presença de células inflamatórias mononucleares, proliferação de fibroblastos e queratinócitos e também pela formação de tecido de granulação, com a proliferação de células endoteliais e a deposição de moléculas da matriz extracelular, ocorrendo entre dois e dez dias após a lesão. Os fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente sob a forma de colágeno, que finalmente formam a maior parte da cicatriz madura. A fase final representa a maturação do novo tecido formado e o remodelamento se inicia entre duas a três semanas após a lesão, podendo durar de um ano ou mais. Além disso, de seis a doze meses, a matriz celular está ativamente remodelada a partir de um “backbone” de colágeno tipo III principalmente para uma predominância composta de colágeno tipo I (KOMESU *et al.*, 2004; GURTNER *et al.*, 2008).

Os macrófagos controlam a celularidade de feridas, devido a sua capacidade para induzir a apoptose e a fagocitose de uma variedade de células de feridas. Células-alvo de macrófagos incluem neutrófilos durante a fase inflamatória do reparo, fibroblastos e células endoteliais durante sua resolução (BRANCATO; ALBINA, 2011). Macrófagos liberam sinais inflamatórios adicionais, como fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) (BECKER; THRASIVOULOU; PHILLIPS, 2012).

Em incisões dorsais realizadas em ratos Sprague-Dawley diabéticos, observou-se a taxa de cicatrização durante a intervenção de uma semana com protocolos de estimulação com corrente pulsada de alta tensão (HVPCS). Verificou-se que houve redução significativa do tamanho de feridas e a taxa de cicatrização indicou contração da ferida, que inicialmente ocorre sem o envolvimento de miofibroblasto. Após os fibroblastos estimulados por TGF- $\beta$  diferenciarem-se em miofibroblastos, células responsáveis pela contração da ferida. O TGF- $\beta$  estimula diretamente a síntese de colágeno e diminui a degradação da matriz extracelular por fibroblastos (BLAKYTN; JUDE, 2006).

O colágeno é fundamental para a força e a integridade da matriz extracelular (MEC) e para epitelização durante as últimas fases da cicatrização e está envolvido na manutenção da estrutura e na integridade cutânea. Na fase proliferativa, TGF- $\beta$ 1 produzido por macrófagos ativados tem influência positiva sobre a angiogênese e epitelização estimulando queratinócitos (KIM; CHO; LEE, 2014).

A família TGF- $\beta$  de proteínas atraem macrófagos para a área da ferida e estimula a produção de citocinas adicionais, para aumentar fibroblastos do músculo liso e da quimiotaxia para modular a expressão de colágeno e formação de cicatriz (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). TGF- $\beta$ 1 desempenha um papel importante na regulação da reparação de feridas por repitelização, suprimindo a inflamação e promovem a regeneração do tecido conjuntivo e a formação de cicatriz (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Amostras da pele de diabéticos manifestam uma capacidade reduzida de crescimento dos fibroblastos dérmicos associada á anomalias do metabolismo da MEC. Como uma macromolécula extracelular, colágeno é o componente principal de MEC e a proteína estrutural mais abundante em tecidos da pele. A derme de pele é constituída por 80% de colágeno tipo I, e o restante é principalmente de colágeno tipo III (MOURA *et al.*, 2014). Os fibroblasto são responsáveis para a produção de colágeno, e numerosas estruturas de colágeno precisam ser reconstituídas após a lesão de pele. Os fatores de crescimento de tecidos especiais, como TGF- $\beta$ , o fator de crescimento mais potente envolvidos na cicatrização de feridas, desempenha um papel chave na resposta inflamatória, a angiogênese, a repitelialização, e deposição de MEC, e nos tecidos da pele de diabéticos onde o remodelamento e metabolismo anormal de colágeno pode estar

alterados na deficiência deste fator. Modificação da relação de colágeno I/III pode contribuir para o enfraquecimento da derme e estar envolvida na patogênese da microestrutura anormal da pele em pacientes com DM (REN *et al.*, 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Comparar o processo de infecção por *C. albicans* e reparo tecidual em camundongos diabéticos e não diabéticos.

##### 3.1.1 Específicos

- ✓ Identificar a presença de *C. albicans* no percurso da infecção;
- ✓ Identificar a morfologia de *C. albicans* predominante durante a infecção;
- ✓ Quantificar a presença de fagócitos mononucleares totais e os alternativamente ativados (M2) durante o processo de infecção;
- ✓ Analisar a participação de citocinas ant-inflamatórias na ativação alternativa de macrófagos M2;
- ✓ Analisar o reparo tecidual através dos tipos de colágenos I e III;
- ✓ Dosar citocinas de perfil Th2 anti-inflamatórias no linfonodo poplíteo e correlacioná-las com o reparo tecidual;

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ARSLAN, S.; KOÇ, A. N.; ŞEKERCİ, A. E.; TANRIVERDİ, F.; SAV, H.; AYDEMİR, G.; DİRİ, H. Genotypes and virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, v. 46, p. 18–27, 2016.
- BACHMANN, S. P.; VANDEWALLE, K.; RAMAGE, G.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; GRAYBILL, J. R.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3591–6, Nov. 2002.
- BECKER, D. L.; THRASIVOULOU, C.; PHILLIPS, A. R. J. Connexins in wound healing; perspectives in diabetic patients. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1818, n. 8, p. 2068–75, Aug. 2012.
- BLAKYTNY, R.; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 23, n. 6, p. 594–608, Jun. 2006.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular Toll-like Receptors. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 305–315, Mar. 2010.
- BRANCATO, S. K.; ALBINA, J. E. Wound Macrophages as Key Regulators of Repair. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 19–25, Jan. 2011.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S–34S, Jun. 2006.
- CAMPOIS, T. G.; ZUCOLOTO, A. Z.; DE ALMEIDA ARAUJO, E. J.; SVIDIZINSKI, T. I. E.; ALMEIDA, R. S.; DA SILVA QUIRINO, G. F.; HARANO, R. M.; CONCHON-COSTA, I.; FELIPE, I. Immunological and histopathological characterization of cutaneous candidiasis. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 8, p. 810–7, 1 Aug. 2015.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, Aug. 2002.
- CASANOVA, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; MARTINEZ, J. P.; SENTANDREU, R. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. **Infection and immunity**, v. 60, n. 11, p. 4898–906, Nov. 1992.
- CHAMBÔ FILHO, A.; SOUZA FILHO, J. B. DE; PIGNATON, C. C.; ZON, I.; FERNANDES, A. S.; CARDOSO, L. Q. Chronic mucocutaneous candidiasis: a case with exuberant cutaneous horns in nipples. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 641–4, 2014.

- CHEN, Y.-C.; WU, C.-C.; CHUNG, W.-L.; LEE, F.-J. S. Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. Pt 11, p. 3743–54, Nov. 2002.
- COSTA, L.; VIEIRA, S. Quality of life of adolescents with type 1 diabetes. **Clinics**, v. 70, n. 3, p. 173–179, 30 Mar. 2015.
- COTA, E.; HOYER, L. L. The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis. **Future microbiology**, v. 10, p. 1635–548, Oct. 2015.
- D'OSTIANI, C. F.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 10, p. 1661–74, 15 May 2000.
- DE BERNARDIS, F.; CASSONE, A.; STURTEVANT, J.; CALDERONE, R. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 1887–92, May 1995.
- DEPNER, M.; FUCHS, S.; RAABE, J.; FREDE, N.; GLOCKER, C.; DOFFINGER, R.; GKRAKIA-KLOTSAS, E.; KUMARARATNE, D.; ATKINSON, T. P.; SCHROEDER, H. W.; NIEHUES, T.; DÜCKERS, G.; STRAY-PEDERSEN, A.; BAUMANN, U.; SCHMIDT, R.; FRANCO, J. L.; ORREGO, J.; BEN-SHOSHAN, M.; MCCUSKER, C.; et al. The Extended Clinical Phenotype of 26 Patients with Chronic Mucocutaneous Candidiasis due to Gain-of-Function Mutations in STAT1. **Journal of Clinical Immunology**, 25 Nov. 2015.
- DORADO, P. J. H. Type 1 diabetes mellitus. **Rev Soc Bol Ped**, v. 47, p. 90–96, 2008.
- DORNAS, W. C.; NAGEM, T. J.; DE OLIVEIRA, T. T.; CONTELLI, R. Aloxaño e diabetes. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, p. 81–87, 2006.
- ELAHI, S.; PANG, G.; CLANCY, R.; ASHMAN, R. B. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 10, p. 5771–7, Oct. 2000.
- EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 26 Suppl 1, p. S5–20, Jan. 2003.
- FERWERDA, B.; FERWERDA, G.; PLANTINGA, T. S.; WILLMENT, J. A.; VAN SPRIEL, A. B.; VENSELAAR, H.; ELBERS, C. C.; JOHNSON, M. D.; CAMBI, A.; HUYSAMEN, C.; JACOBS, L.; JANSEN, T.; VERHEIJEN, K.; MASTHOFF, L.; MORRÉ, S. A.; VRIEND, G.; WILLIAMS, D. L.; PERFECT, J. R.; JOOSTEN, L. A. B.; et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 18, p. 1760–7, 29 Oct. 2009.
- GE, Y.; PENG, H.; SHENG, X.; ZHANG, G.; ZHOU, J.; WANG, M.; ZHOU, X.; HUANG, K. Effects of alloxan-induced diabetes on the expression of insulin signal transmission molecules. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 14, n. 5, p. 447–451, 18 Oct. 2009.
- GENSEL, J. C.; ZHANG, B. Macrophage activation and its role in repair and

pathology after spinal cord injury. **Brain Research**, v. 1619, p. 1–11, Sep. 2015.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, Jan. 2003.

GOW, N. A. R.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–22, Feb. 2012.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 May 2008.

HEINTZ-BUSCHART, A.; EICKHOFF, H.; HOHN, E.; BILITEWSKI, U. Identification of inhibitors of yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans* by a reporter screening assay. **Journal of biotechnology**, v. 164, n. 1, p. 137–42, 10 Mar. 2013.

HERNÁNDEZ-SANTOS, N.; HUPPLER, A. R.; PETERSON, A. C.; KHADER, S. A.; MCKENNA, K. C.; GAFFEN, S. L. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 5, p. 900–910, 19 Sep. 2013.

**International Diabetes Federation**. Disponível em:

<<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 6 nov. 2015.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 197–216, 2002.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, C.; LORENZ, M. C. Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 11, p. e1003741, 2013.

KADOSH, D.; JOHNSON, A. D. Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 6, p. 2903–12, Jun. 2005.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–24, 2009.

KASHEM, S. W.; IGYÁRTÓ, B. Z.; GERAMI-NEJAD, M.; KUMAMOTO, Y.; MOHAMMED, J.; JARRETT, E.; DRUMMOND, R. A.; ZURAWSKI, S. M.; ZURAWSKI, G.; BERMAN, J.; IWASAKI, A.; BROWN, G. D.; KAPLAN, D. H. *Candida albicans* Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 356–366, Feb. 2015.

KIM, T. H.; CHO, H.-Y.; LEE, S. M. High-voltage pulsed current stimulation enhances wound healing in diabetic rats by restoring the expression of collagen,  $\alpha$ -smooth muscle actin, and TGF- $\beta$ 1. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 234, n. 1, p. 1–6, 30 Jun. 2014.

KING, A.; BOWE, J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochemical Pharmacology**, v. 99, p. 1–10, Jan. 2016.

KIRKPATRICK, C. H. Chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3 Pt 2, p. S14–7, Sep. 1994.

KNIP, M.; SILJANDER, H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes.

**Autoimmunity reviews**, v. 7, n. 7, p. 550–7, Jul. 2008.

KOIVUKANGAS, V.; ANNALA, A. P.; SALMELA, P. I.; OIKARINEN, A. Delayed restoration of epidermal barrier function after suction blister injury in patients with diabetes mellitus. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 16, n. 7, p. 563–7, Jul. 1999.

KOMESU, M. C.; TANGA, M. B.; BUTTROS, K. R.; NAKAO, C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP**, v. 11, n. 2, p. 63–67, Oct. 2004.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v. 31, n. 6, p. 337–42, Jun. 1988.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413–421, Dec. 1998.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 177–189, Apr. 2006.

MCDONALD, D. R. TH17 deficiency in human disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 129, n. 6, p. 1429–35; quiz 1436–7, Jun. 2012.

MCLETCHE, N. G. Alloxan diabetes: a discovery, albeit a minor one. **The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 32, n. 2, p. 134–42, Jan. 2002.

MILLS, C. D. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. May, p. 1–12, 5 May 2015.

MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. **Medical microbiology and immunology**, v. 202, n. 3, p. 183–95, 25 Jun. 2013.

MOTAUNG, T. E.; ALBERTYN, J.; POHL, C. H.; KÖHLER, G. *Candida albicans* mutant construction and characterization of selected virulence determinants. **Journal of Microbiological Methods**, v. 115, p. 153–165, Aug. 2015.

MOURA, L. I. F.; DIAS, A. M. A.; SUESCA, E.; CASADIEGOS, S.; LEAL, E. C.; FONTANILLA, M. R.; CARVALHO, L.; DE SOUSA, H. C.; CARVALHO, E. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 1, p. 32–43, Jan. 2014.

MUHAMMAD, S. A.; FATIMA, N.; SYED, N.; WU, X.; YANG, X. F.; CHEN, J. Y. MicroRNA Expression Profiling of Human Respiratory Epithelium Affected by Invasive *Candida* Infection. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136454, 2015.

NAGASHIMA, T.; MIYANOSHITA, A.; SAKIYAMA, Y.; OZAKI, Y.; STAN, A. C.; NAGASHIMA, K. Cerebral vasculitis in chronic mucocutaneous candidiasis: autopsy case report. **Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology**, v. 20, n. 4, p. 309–14, Dec. 2000.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. R. An integrated

model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67–78, Jan. 2008.

NEWMAN, S. L.; BHUGRA, B.; HOLLY, A.; MORRIS, R. E. Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. **Infection and immunity**, v. 73, n. 2, p. 770–7, Feb. 2005.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 5, p. 1352–1363, Nov. 2013.

OLIVEIRA, J. E. P. DE; MILECH, A. **Diabetes Mellitus - Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: [s.n.].

PABLO, J.; DORADO, H. Diabetes mellitus tipo 1. v. 47, n. 2, p. 90–96, 2008.

PERICOLINI, E.; GABRIELLI, E.; AMACKER, M.; KASPER, L.; ROSELLETTI, E.; LUCIANO, E.; SABBATINI, S.; KAESER, M.; MOSER, C.; HUBE, B.; VECCHIARELLI, A.; CASSONE, A. Secretory Aspartyl Proteinases Cause Vaginitis and Can Mediate Vaginitis Caused by *Candida albicans* in Mice. **mBio**, v. 6, n. 3, p. e00724, 2015.

RAJA, M.; KINNE, R. K. H. Pathogenic mutations causing glucose transport defects in GLUT1 transporter: The role of intermolecular forces in protein structure-function. **Biophysical Chemistry**, v. 200-201, p. 9–17, May 2015.

REDDY, S.; YOUNG, M.; POOLE, C. A.; ROSS, J. M. Loss of glucose transporter-2 precedes insulin loss in the nonobese diabetic and the low-dose streptozotocin mouse models: a comparative immunohistochemical study by light and confocal microscopy. **General and comparative endocrinology**, v. 111, n. 1, p. 9–19, Jul. 1998.

REN, M.; HAO, S.; YANG, C.; ZHU, P.; CHEN, L.; LIN, D.; LI, N.; YAN, L. Angiotensin II regulates collagen metabolism through modulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in diabetic skin tissues. **Diabetes & vascular disease research**, v. 10, n. 5, p. 426–35, Sep. 2013.

ROMÁN, E.; ARANA, D. M.; NOMBELA, C.; ALONSO-MONGE, R.; PLA, J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 181–190, Apr. 2007.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–288, 11 Apr. 2011.

SAITO, H.; TAMURA, M.; IMAI, K.; ISHIGAMI, T.; OCHIAI, K. Catechin inhibits *Candida albicans* dimorphism by disrupting Cek1 phosphorylation and cAMP synthesis. **Microbial pathogenesis**, v. 56, p. 16–20, Mar. 2013.

SANTORO, M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, n. 1, p. 274–286, 10 Mar. 2005.

SATO, T.; WATANABE, T.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 5, p. 751–2, May 2004.

- SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–77, Nov. 2005.
- SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; SCHÄFER, W.; BASTERT, J.; CHEN, W.; HUBE, B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Molecular microbiology**, v. 34, n. 1, p. 169–80, Oct. 1999.
- SCHALLER, M.; SCHACKERT, C.; KORTING, H. C.; JANUSCHKE, E.; HUBE, B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 114, n. 4, p. 712–7, Apr. 2000.
- SCHALLER, M.; SCHÄFER, W.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. **Molecular microbiology**, v. 29, n. 2, p. 605–15, Jul. 1998.
- SHAPIRO, R. S.; SELLAM, A.; TEBBJI, F.; WHITEWAY, M.; NANTEL, A.; COWEN, L. E. Pho85, Pcl1, and Hms1 signaling governs *Candida albicans* morphogenesis induced by high temperature or Hsp90 compromise. **Current biology : CB**, v. 22, n. 6, p. 461–70, 20 Mar. 2012.
- SIMPSON, T. C.; NEEDLEMAN, I.; WILD, S. H.; MOLES, D. R.; MILLS, E. J. Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes. In: SIMPSON, T. C. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.
- SPARBER, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. Interleukin 17-Mediated Host Defense against *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 4, n. 3, p. 606–619, 12 Aug. 2015.
- SUÁREZ, B. L.; ALVAREZ, M. I.; DE BERNAL, M.; COLLAZOS, A. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. **Colombia médica (Cali, Colombia)**, v. 44, n. 1, p. 26–30, Jan. 2013.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 50, n. 6, p. 537–46, 2001.
- TEKELI, A.; DOLAPCI, I.; EMRAL, R.; CESUR, S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. **Mycoses**, v. 47, n. 7, p. 315–8, Aug. 2004.
- TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179–90, Mar. 2007.
- TSCHERNER, M.; ZWOLANEK, F.; JENULL, S.; SEDLAZECK, F. J.; PETRYSHYN, A.; FROHNER, I. E.; MAVRIANOS, J.; CHAUHAN, N.; VON HAESELER, A.; KUCHLER, K. The *Candida albicans* Histone Acetyltransferase Hat1 Regulates Stress Resistance and Virulence via Distinct Chromatin Assembly Pathways. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005218, Oct. 2015.
- VAN DER GRAAF, C. A. A.; NETEA, M. G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7458–64, Nov. 2005.

- VEDIYAPPAN, G.; DUMONTET, V.; PELISSIER, F.; D'ENFERT, C. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74189, 2013.
- VERMA-GAUR, J.; QU, Y.; HARRISON, P. F.; LO, T. L.; QUENAULT, T.; DAGLEY, M. J.; BELLOUSOFF, M.; POWELL, D. R.; BEILHARZ, T. H.; TRAVEN, A. Integration of Posttranscriptional Gene Networks into Metabolic Adaptation and Biofilm Maturation in *Candida albicans*. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005590, 16 Oct. 2015.
- WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans* \*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 529–553, Oct. 2007.
- WIBAWA, T.; PRASENO; AMAN, A. T. Virulence of *Candida albicans* isolated from HIV infected and non infected individuals. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 408, 11 Dec. 2015.
- WILLIS, A. M.; COULTER, W. A.; FULTON, C. R.; HAYES, J. R.; BELL, P. M.; LAMEY, P. J. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 91, n. 3, p. 317–21, Mar. 2001.
- WU, H.; DOWNS, D.; GHOSH, K.; GHOSH, A. K.; STAIB, P.; MONOD, M.; TANG, J. *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 6, p. 2132–44, Jun. 2013.
- ZANOLI, L.; GRANATA, A.; LENTINI, P.; RASTELLI, S.; FATUZZO, P.; RAPISARDA, F.; CASTELLINO, P. Sodium-Glucose Linked Transporter-2 Inhibitors in Chronic Kidney Disease. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–6, 2015.
- ZHAO, X.; OH, S.-H.; CHENG, G.; GREEN, C. B.; NUESSEN, J. A.; YEATER, K.; LENG, R. P.; BROWN, A. J. P.; HOYER, L. L. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, n. Pt 7, p. 2415–28, Jul. 2004.
- ZHENG, J.; VAN DE VEERDONK, F. L.; CROSSLAND, K. L.; SMEEKENS, S. P.; CHAN, C. M.; AL SHEHRI, T.; ABINUN, M.; GENNERY, A. R.; MANN, J.; LENDREM, D. W.; NETEA, M. G.; ROWAN, A. D.; LILIC, D. Gain-of-function STAT1 mutations impair STAT3 activity in patients with chronic mucocutaneous candidiasis (CMC). **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2834–2846, Oct. 2015.
- ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). **Annual review of immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–89, 2010.

## 5 ARTIGO

### **Infection and tissue repair of experimental cutaneous candidiasis in diabetic mice**

Andréia Carla Eugenio Pupim<sup>1,2</sup>, Tacito Graminha Campos<sup>1</sup>, Eduardo José de Almeida Araújo<sup>2</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidizinski<sup>3</sup>, Ionice Felipe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380 – 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Histology, Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380 – 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Clinical Analysis, Center for Health Sciences, State University of Maringá, Av .Colombo, 5790, Bloco111 Sala05 CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

\*Author to whom correspondence should be addressed;

Ionice Felipe

E-Mail:ionicefelipe@gmail.com

#### **Abstract**

Diabetic patients seem to be predisposed to cutaneous candidiasis, and given the high complexity of this disease, the mechanisms of effector molecules and cells that participate in the immune response merit better understanding. In a previous study, we used an experimental model of cutaneous candidiasis in immunocompetent BALB/c mice, where we demonstrated a balance between inflammatory and antiinflammatory cytokines, allowing the elimination of pathogens and cure of the disease. Here, the mice were treated with alloxan by the endovenous route and all animals with blood glucose levels >250 mg/dL received *Candida albicans* intradermally in the hind paw and were studied up to 21 days. Control groups were not treated with alloxan and underwent the same procedures. We evaluated the interference of diabetic conditions in alloxan-induced diabetic mice in relation to the development of *C. albicans* infection, density of macrophages, distribution of collagen type I and III, antiinflammatory cytokines involved in the transition of M1 to M2 macrophages and tissue repair, compared with non-diabetic mice. Diabetic mice showed a significant decrease in the density of F4/80 macrophages, as well delayed elimination of *C. albicans*. Differentiation to M2 macrophages was late and activated by IL-13 and TGF- $\beta$ , while IL-4 production was significantly lower ( $p < 0.001$ ) compared to control. There was significant ( $p < 0.01$ ) loss of collagen type I, as compared to non-diabetic mice, and collagen type III was produced late with interference of IL-13 and TGF- $\beta$  production. These findings can be useful in understanding the mechanisms involved in chronic cutaneous candidiasis.

**Keywords:** experimental cutaneous candidiasis, diabetes-induced by alloxan, M1 and M2 macrophages, collagen type I and III, antiinflammatory cytokines.

## Introduction

Diabetes affects hundreds of millions of people worldwide, and these individuals exhibit a documented impairment in the healing of acute wounds. Moreover, this population chronic non-healing diabetic foot ulcers, which are estimated to occur in 15% of all persons with diabetes. These ulcers are a serious complication of diabetes and precede 84% of all diabetes-related lower leg amputations, mainly when coupled with an impaired ability to fight infection [1].

Fungal infections are the most frequent cutaneous manifestations in diabetic patients [2], and candidiasis is a leading occurrence [3]. Diabetic patients seem predisposed to cutaneous candidiasis, as shown in a study by Papini *et al.* (2013) [4], in which onychomycosis was observed in 53.3% and foot skin mycosis in 46.7% of cases. Both fungal infections showed significantly higher prevalence compared to the control group [5]. Given the high complexity in humans, the effector molecules and cells involved in the immune response to cutaneous candidiasis still remain to be elucidated.

In adult humans, optimal wound healing involves the following the events: 1-rapid hemostasis; 2-appropriate inflammation; 3- mesenchymal cell differentiation, proliferation, and migration to the wound site; 4-suitable angiogenesis; 5- prompt re-epithelialization (re-growth of epithelial tissue over the wound surface); and 6- proper synthesis, cross-linking, and alignment of collagen to provide strength to the healing tissue [6-8].

In our previous study, we established a model of cutaneous *C. albicans* infection in BALB/c mice to investigate disease progression, to understand specific cellular and molecular components involved in immunity to *Candida* and to determine the balance between pro- and antiinflammatory cytokines over the course of infection [9]. In this study, we evaluated the interference of diabetic conditions in alloxan-induced diabetic mice in relation to the development of *C. albicans* infection, density of macrophages, distribution of collagen type I and III, antiinflammatory cytokines involved with transition of M1 to M2 macrophages and tissue repair.

## Materials and Methods

Ethical approval:

The experimental protocols were approved by the Animal Research Ethics Committee of State University of Londrina, Brazil (Approval number 188/12). All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

### Mice and Induction of Diabetes

Female BALB/c mice were obtained from State University of Maringá and housed five animals per cage in a temperature- and humidity-controlled room with a 12 h light/dark cycle, and they received sterilized water and food *ad libitum*. BALB/c mice received a single dose of alloxan (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) via the tail vein at a dose of 65 mg/kg body weight [10]. All animals were 8 weeks of age at the start experiments. Mice were considered diabetic if their blood glucose was >250 mg/dL. Blood glucose measurements were performed with an ACCU-CHEK Active test strip glucometer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using blood samples from the tail vein. Control mice were not treated with alloxan.

### *Candida albicans* Culture

*C. albicans* strain 577 was isolated from the skin of a patient with mucocutaneous candidiasis and kindly provided by Dr. Luiz Rodolfo Travassos, UNIFESP, São Paulo, Brazil. Fungal cells were grown in 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose (YPD), at 28°C for 24 h. The cells collected by centrifugation were resuspended in YPD plus 10% fetal bovine serum (FBS) at a concentration of  $5 \times 10^6$  yeast cells/ml and incubated at 37°C for 2 h, to produce pseudohyphae, as described by Kagami *et al.* [11]. Microscopic examination confirmed that  $85.7 \pm 3.8\%$  of the cells of this strain converted to pseudohyphae.

### Cutaneous *Candida albicans* Infection and Fungal Load

Two main groups were used, one treated with alloxan and considered diabetics and another one made up of healthy animals (non-diabetic mice). Five mice per diabetic or healthy subgroup were inoculated with *C. albicans* pseudohyphae ( $5 \times 10^6/50 \mu\text{L}$  PBS) in the dermis of the hind paw, and PBS solution was injected into the contralateral paw as a negative control. After 1, 4, 7, 14 and 21 days, the site of infected skin on the hind paw and the popliteal lymph nodes were collected, weighed and macerated. Homogenates of popliteal lymph nodes were then centrifuged, and the clear supernatants were collected and kept in the freezer at -20°C for later determination of cytokines according to a previous study [9].

### Periodic Acid-Schiff Staining of Yeast and Filamentous Forms of *Candida*

Similar groups of mice as described above were evaluated histopathologically. The collected hind paw tissues were fixed in 10% formalin for 24 h and then subjected to histological processing for paraffin embedding. Serial histological 4- $\mu\text{m}$  sections were stained with periodic acid-Schiff (PAS) because *Candida* species stain poorly with hematoxylin and eosin. PAS staining is a histochemical technique used because it stains polysaccharides and chitin present in the fungal cell wall. In this study, PAS was used to identify the morphological features of the fungus as well the localization and extension of infection. Small budding yeast or filamentous forms (pseudohyphae, hyphae) show strong cell wall PAS staining as pinkish red.

### Immunohistochemistry

The protocols of Kagami *et al.* [11] were used for immunohistochemistry. Histological sections, 4  $\mu\text{m}$  thick, of skin from the infected hind paw were deparaffinized in xylene and hydrated in a graded alcohol series. The sections were incubated in 10 mM citric acid (pH 6) at 95°C for 30 min for antigen retrieval, and endogenous peroxidase activity was quenched by treating sections with 3% hydrogen peroxide for 5 min at room temperature. Sections were blocked with 2% BSA, 0.5% Triton X-100 and 10% goat serum in PBS for 60 min at room temperature, followed by incubation with primary rat anti-F4/80 (Santa Cruz, SC-52664, 1:50), or rabbit anti-arginase I, (Santa Cruz, SC-20150, 1:50), overnight at 4°C. Samples were washed and incubated at room temperature for 90 min with secondary peroxidase-conjugated goat anti-rat (Vector Laboratories PI-9400, 1:500) or peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Vector Laboratories PI-1000, 1:500), developed using

diaminobenzidine substrate kit for peroxidase (eBioscience), counterstained with Harris' hematoxylin and mounted with Permount<sup>®</sup>. From each mouse, thirty microscopic fields of infected hind paw were captured using a high-resolution camera (Moticam 2500, 5.0 M pixel USB 2.0) attached to light microscope Axiophot Zeiss Axiophot (63x immersion objective). Motic Images Plus 2.0 was used for analysis. We counted the total number of macrophages (F4/80<sup>+</sup>) and M2 (arginase I<sup>+</sup>) macrophages in each mouse during the development of the infection. The number of macrophages was expressed per mm<sup>2</sup>.

#### Quantification of Collagen

Histological sections, 4 µm thick, of skin from the infected hind paw were deparaffinized in xylene and hydrated with a graded alcohol series. The sections were stained by Picrosirius red staining for quantification of collagen types I and III using polarized light. Accordingly, ten images from each mouse were captured using an AxioCam high-resolution camera (Carl Zeiss, Jena, Germany) attached to an Axioscop Plus light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany; 40x objective) using the software AxioVisionRel 4.1. The images were evaluated with the software Image-Pro Plus 4.5 to obtain the number of pixels of yellow and red fibers (type I collagen) and green fibers (type III collagen). Results were expressed in percentage (%).

#### Cytokines Analysis

To determine the concentration of antiinflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-β), the supernatants of the homogenates of infected and control skin described above were submitted to capture ELISA procedures (eBioscience, San Diego, CA). The cytokine quantification assays were performed in accordance with the manufacturer's instruction.

#### Statistical Analysis

For analysis of epidermal thickness, first the data were analyzed according to the type of distribution. All data presented normal distribution, so groups were compared in pairs using the unpaired *Student* t test considering 5% significance level. Tests were performed by the software GraphPad Prism version 5.0. For cytokines analysis the differences between groups were analyzed using one-way ANOVA was applied. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

#### Monitoring of glycemia during the infection

The mice were treated with alloxan to generate diabetes conditions with selective destruction of insulin-producing pancreatic cells in the islets of Langerhans. Samples of blood from the tail venous in alloxan induced-diabetic group showed glucose level increased significantly to  $272.8 \pm 19.3$  mg/dL one day post-treatment. Control mice (non-diabetic) showed a blood glucose level of  $98.2 \pm 7.4$  mg/dL. Control mice were considered

immunocompetent. The glucose level was evaluated per mice right before euthanasia to confirm the diabetic conditions during course of infection.

Skin from mice infected with *Candida albicans* and stained with Periodic Acid Schiff.

Diabetic mice infected with *C. albicans* showed a higher fungal burden (Fig. 1B) with predominance of filamentous forms (psedohyphae and hyphae) compared to non-diabetic mice whose dermis had a predominance of yeast cells one day post-infection as observed in Fig. 1A. From the fourth day post-infection, the injured tissue in the dermis of diabetic mice displayed rupture of tissue and disorganizations of extra cellular matrix up to day 14 (Fig. 1 D,F,H). These results suggested an impaired ability to fight infection caused by alloxan-treatment, making the diabetic mice largely unable to mount an adequate inflammatory response. The elimination of pathogens occurred earlier in non-diabetic mice at seven days post-infection, and tissue organization was little affected (Fig. 1 C,E,G I).

Population density of F4/80 and M2 macrophages.

Considering the possibility of diabetic mice showing disturbances in the functions or number of macrophages, the next step was to study the density of macrophages at the infection site using F4/80 as marker. We observed F4/80 macrophages significantly reduced in diabetic mice compared to non-diabetic mice at day four post-infection (Fig 2A, B and E;  $p < 0.05$ ). In addition, the activation of the alternative pathway to M2 was hindered, since the population of macrophages marked with anti-arginase I was significantly reduced between 14 and 21 days post-infection (Fig. 2C, D and F;  $p < 0.001$ ).

Analysis of antiinflammatory cytokines during infectious process.

To understand the deregulation of M1 and M2 macrophage polarization in induced diabetes type I by treatment with alloxan, we determined the profile of anti-inflammatory cytokines. The level of IL-4 was significantly reduced in the diabetic group at four days post infection compared with non-diabetic mice (Fig. 3A;  $p < 0.001$ ). In this study, IL-13 was present (Fig. 3B) and displayed a critical role in the transition of M1 to M2 macrophages considering that IL-4 production was insignificant for this effective function. Besides, we found a delay in physiological levels of TGF1-  $\beta$  in the diabetic mice, which occurred only in late phase of infection at 21 days compared to non-diabetic mice (Fig. 3C). The level of IL-10 was significantly reduced in the diabetic group at four days post infection compared with non-diabetic mice (Fig. 3D;  $p < 0.001$ ).

Analysis of collagen Type I and III in skin from infected mice

Type I collagen was slightly affected in the early phase of infection but there was critical reduction between days 7 and 21 in diabetic mice (Fig. 4A,C,E). Besides, the infected tissue in diabetic mice had more type III collagen between days 7 and 21 (Fig. 4B,D,F). These results are associated with the disorganized tissue observed in diabetic mice, which exhibited a higher quantity of filamentous forms of *C. albicans* (Fig. 1D,F,H).

## Discussion

In previous study we established a model of *C. albicans* infection in cutaneous tissues at hind paw of healthy mice, which provided an expanded understand of host defense mechanisms by analyzing paw symptomatology, immunological and histopathological development of infection [9]. Importantly, we demonstrated that a balance between pro-and anti-inflammatory cytokines was fundamental for the resolution of infection opening a new direction to study systemic disorders such as diabetes *mellitus* that predispose an individual to cutaneous candidiasis.

In this study, we demonstrated that diabetic conditions contributed to a more severe development of *C. albicans* infection and became the dermis more disorganized, with destruction of collagen type I, delayed in immune response affecting transition from M1 to M2 macrophages and as consequence an uncompleted tissue repair. It can be related to increase of glucose level in blood and alterations of mechanisms of immune response.

Although *C. albicans* has been administered in pseudohyphae, we observed a predominance of yeast cells in non-diabetic mice whereas diabetic mice showed higher fungal burden and filamentous forms after one day of infection (Fig 1). It has been demonstrated that yeast and hyphae are differentially recognized by immune cells and the cytokine signature induced by yeast and hyphal cells differs significantly [12–14]. The structure that is recognized by TLR4 on yeast cells but is absent or hidden on hyphae and also is not recognized by dectin-1 receptor and therefore non stimulate Th17 immune response [13, 15]. Moreover, mice deficient in IL-17A demonstrated delayed healing after skin infection with *C. albicans* compared with wild-type mice [11]. This study showed that the diabetic condition affected the immune response related to the number and functions of macrophages (Fig2), adding new evidences about the transition of M1 to M2 and is in line with other studies on diabetes that showed decreased chemotaxis of inflammatory cells into the wound, compounded by decreased phagocytosis and intracellular killing, leading to diminished availability of critical factors for effective wound repair [1, 16–18]. Thus, we demonstrated that the reduced number of F4/80 macrophages can be associated to lower elimination of pathogen allowing a higher development of filamentous forms (pseudohyphae and hyphae).

In diabetic mice, IL-13 was secreted at physiological levels in late phase of infection and IL-4 was produced in lower levels compared to non-diabetic mice. These results suggest that IL-13 although produced in late phase of infection had fundamental role in differentiation of M1 to M2 macrophages. Considering the delayed transition in M2 and lower arginase I production (Fig 2), we suggest that tissue repair was prejudiced by this reason, but it does not exclude the participation of secreted aspartyl proteases in increase of intradermic lesions. Secreted aspartyl proteases (SAPs) have been demonstrated in *C. albicans* in filamentous forms (pseudohyphae or hypha), mainly SAP6, enabling this fungus to invade tissues [19, 20]. In previous work we demonstrated physiologic levels of IL-17, IFN- $\gamma$  and IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 in non-diabetic mice [9] with elimination of pathogen. Here, we demonstrate physiologic levels of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-13, TGF- $\beta$  and IL-10) which contributed with transition of M1 to M2 macrophages and adequate process of healing wound. We observed high density of M2 macrophages with abundant arginase I, whose pathway is production of ornithine and polyamines necessary to synthesis of collagen. Moreover, M2 macrophages are characterized by efficient phagocytic activity by mannose receptors and expression of scavenging molecules [21]. As expected, the complete elimination of pathogens was observed earlier in non-diabetic and lately in diabetic mice and associated to M2 macrophages.

Regarding to tissue repair, TGF- $\beta$  can be secreted by M2 macrophages and induces proliferation of fibroblasts as observed in this study by increased production of collagen types I and III (Fig 4). This process of repairing damaged tissue occurred more lately (at 21 days post-infection) in diabetic mice as a consequence of delayed secretion of IL-13 and differentiation of M2 macrophages as well. Our study corroborated the findings of Kim *et al.* 2013 [22] and Gong *et al.* 2012 [23] who demonstrated participation of TGF- $\beta$  in wound healing and differentiation from M1 to M2 macrophages respectively. We suggest that the higher concentration of collagen type III in the diabetic mice was a compensation mechanism to depletion of collagen type I to avoid traction-induced lesions. Moreover, collagen III is required in sites where it is necessary to produce collagen type I [24].

In conclusion, the diabetic condition, as a result of treatment with alloxan, showed alterations in the production of anti-inflammatory cytokines, such as insignificant levels of IL-4, and delay in IL-13 and TGF- $\beta$  production, compared to non-diabetic mice. Thus, the polarized activation of macrophages was affected by delayed M2 macrophage transition and by consequences to tissue repair functions. There was significant loss of collagen type I compared to non-diabetic mice, collagen type III was produced lately due to delayed IL-13 and TGF- $\beta$  production. This knowledge can be useful on understanding the mechanisms involved in chronic cutaneous candidiasis since the identification of mechanisms and molecules associated with polarized activation of macrophages provides a basis for therapeutic strategies.

#### **Author contributions**

Andréia Carla Eugenio Pupim and Tacito Graminha Campos contributed equally to this study.

#### **Acknowledgments**

This study was supported by the Fundação Araucária (298/2012), Paraná, Brazil and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

#### **Conflict of interest**

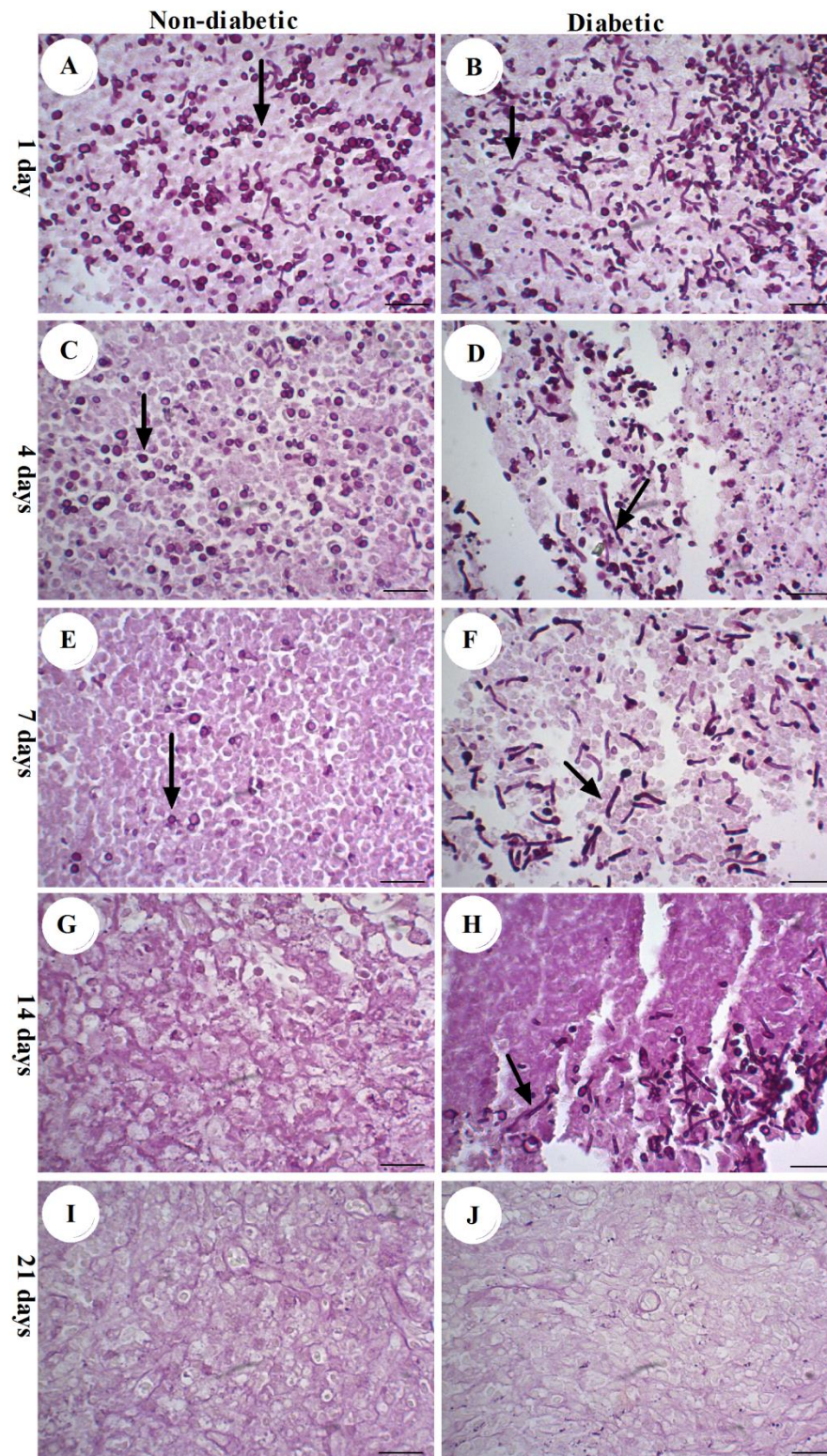
The authors declare that they have no conflict of interest.

#### **References**

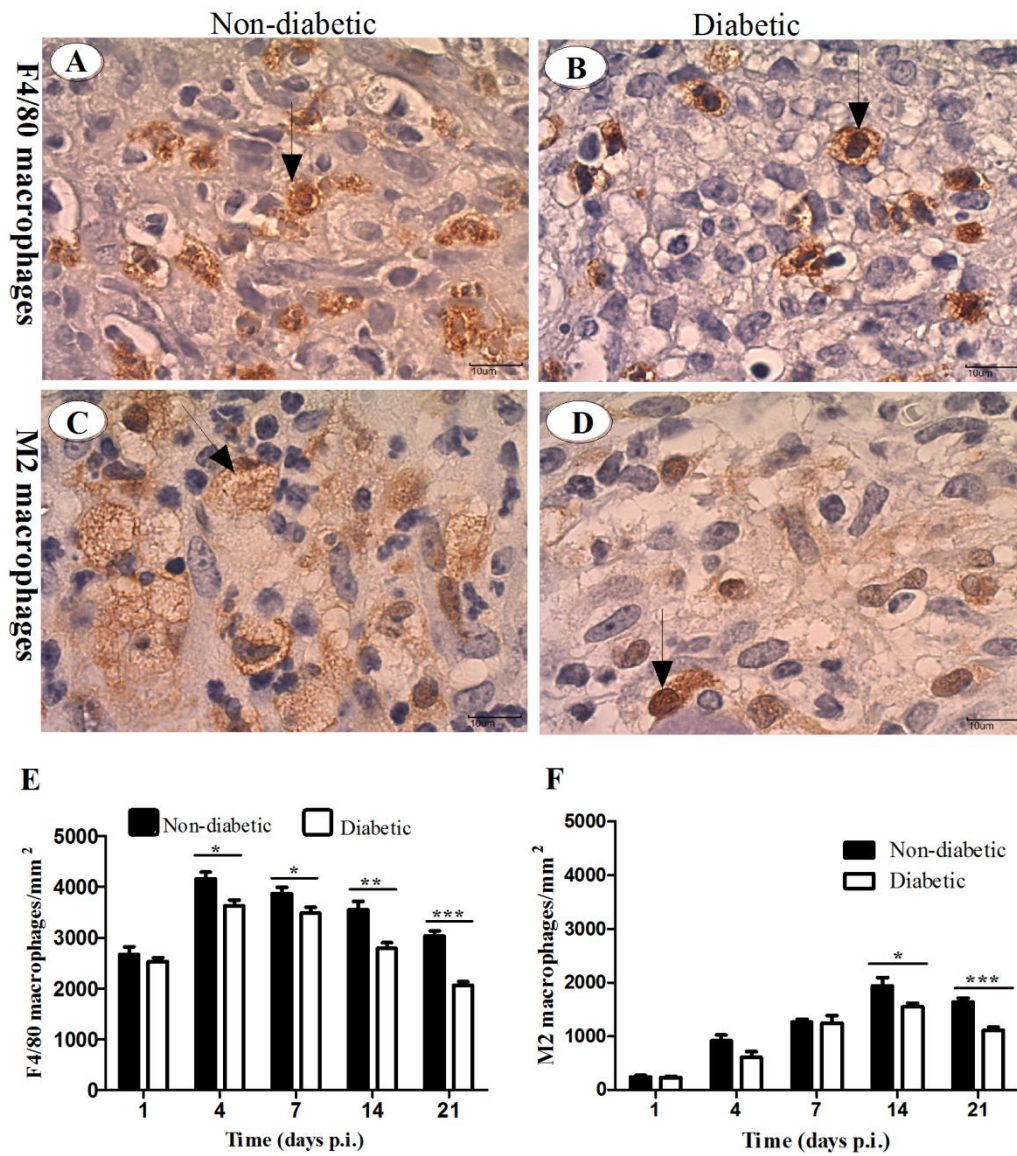
1. Brem H, Tomic-Canic M (2007) Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117:1219–22. doi: 10.1172/JCI32169
2. Thappa D, Agrawal A, Timshina D (2012) A clinical study of dermatoses in diabetes to establish its markers. *Indian J Dermatol* 57:20. doi: 10.4103/0019-5154.92671
3. Mahajan S, Koranne R V, Sharma SK (2003) Cutaneous manifestation of diabetes *mellitus*. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 69:105–8.
4. Papini M, Cicoletti M, Fabrizi V, Landucci P (2013) Skin and nail mycoses in patients with diabetic

- foot. *G Ital di dermatologia e Venereol organo Uff Soc Ital di dermatologia e Sifilogr* 148:603–8.
5. Giri S, Kindo AJ, Kalyani J (2013) Candidemia in intensive care unit patients: a one year study from a tertiary care center in South India. *J Postgrad Med* 59:190–5. doi: 10.4103/0022-3859.118036
  6. Guo S, DiPietro LA (2010) Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 89:219–29. doi: 10.1177/0022034509359125
  7. Gosain A, DiPietro LA (2004) Aging and wound healing. *World J Surg* 28:321–6. doi: 10.1007/s00268-003-7397-6
  8. Mathieu D (2006) *Handbook on Hyperbaric Medicine*. doi: 10.1007/1-4020-4448-8
  9. Campois TG, Zucoloto AZ, de Almeida Araujo EJ, et al. (2015) Immunological and histopathological characterization of cutaneous candidiasis. *J Med Microbiol* 64:810–7. doi: 10.1099/jmm.0.000095
  10. Rohilla A, Ali S (2012) Alloxan Induced Diabetes : Mechanisms and Effects. *Int J Res Pharm Biomed Sci* 3:819–823.
  11. Kagami S, Rizzo HL, Kurtz SE, et al. (2010) IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. *J Immunol* 185:5453–62. doi: 10.4049/jimmunol.1001153
  12. van der Graaf CAA, Netea MG, Verschueren I, et al. (2005) Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 73:7458–64. doi: 10.1128/IAI.73.11.7458-7464.2005
  13. Cheng S-C, van de Veerdonk FL, Lenardon M, et al. (2011) The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 90:357–66. doi: 10.1189/jlb.1210702
  14. Gow N a. R, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10:112–22. doi: 10.1038/nrmicro2711
  15. Kashem SW, Igyártó BZ, Gerami-Nejad M, et al. (2015) *Candida albicans* Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation. *Immunity* 42:356–366. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.008
  16. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL (2006) Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 14:558–65. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x
  17. Falanga V (2005) Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet (London, England)* 366:1736–43. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67700-8
  18. Gallagher KA, Liu Z-J, Xiao M, et al. (2007) Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 117:1249–59. doi: 10.1172/JCI29710
  19. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:400–28, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.67.3.400
  20. Gow NAR, Hube B (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* 15:406–12. doi: 10.1016/j.mib.2012.04.005
  21. Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*

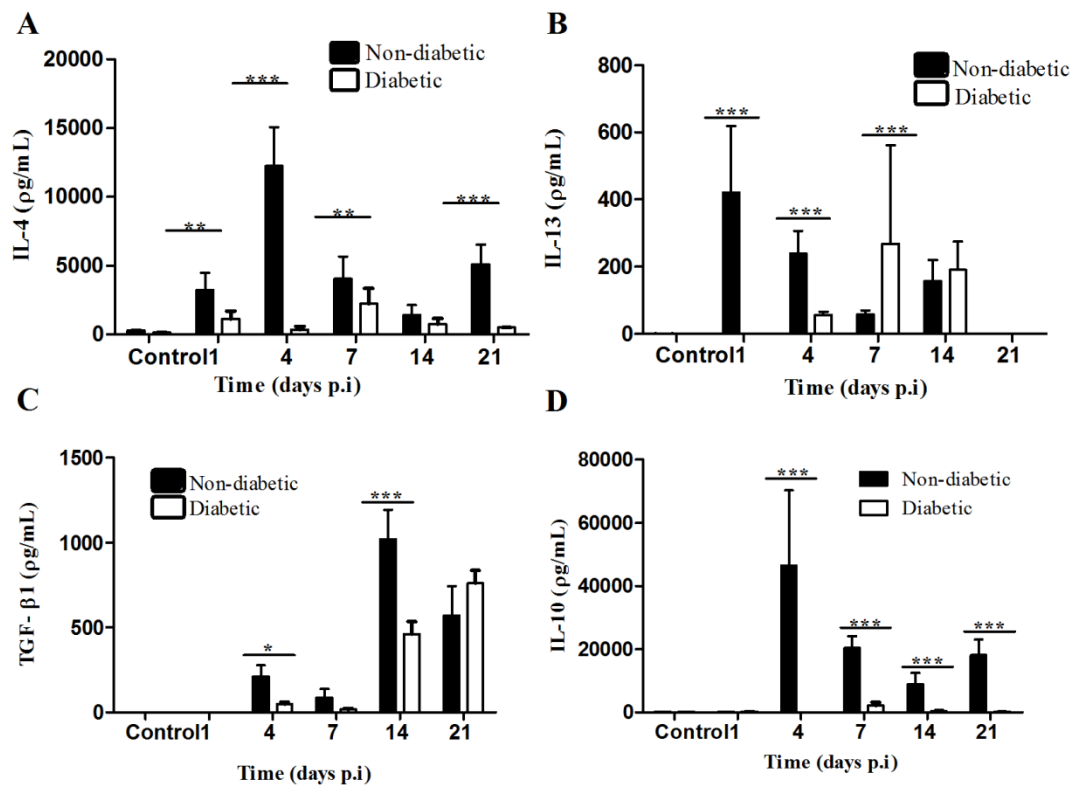
- 122:787–95. doi: 10.1172/JCI59643
22. Kim YJ, Carvalho FC, Souza JAC, et al. (2013) Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- $\beta$  and VEGF production. *Wound Repair Regen* 21:456–63. doi: 10.1111/wrr.12041
  23. Gong D, Shi W, Yi S, et al. (2012) TGF $\beta$  signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol* 13:31. doi: 10.1186/1471-2172-13-31
  24. Liu X, Wu H, Byrne M, et al. (1997) Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1852–6. doi: 10.1073/pnas.94.5.1852



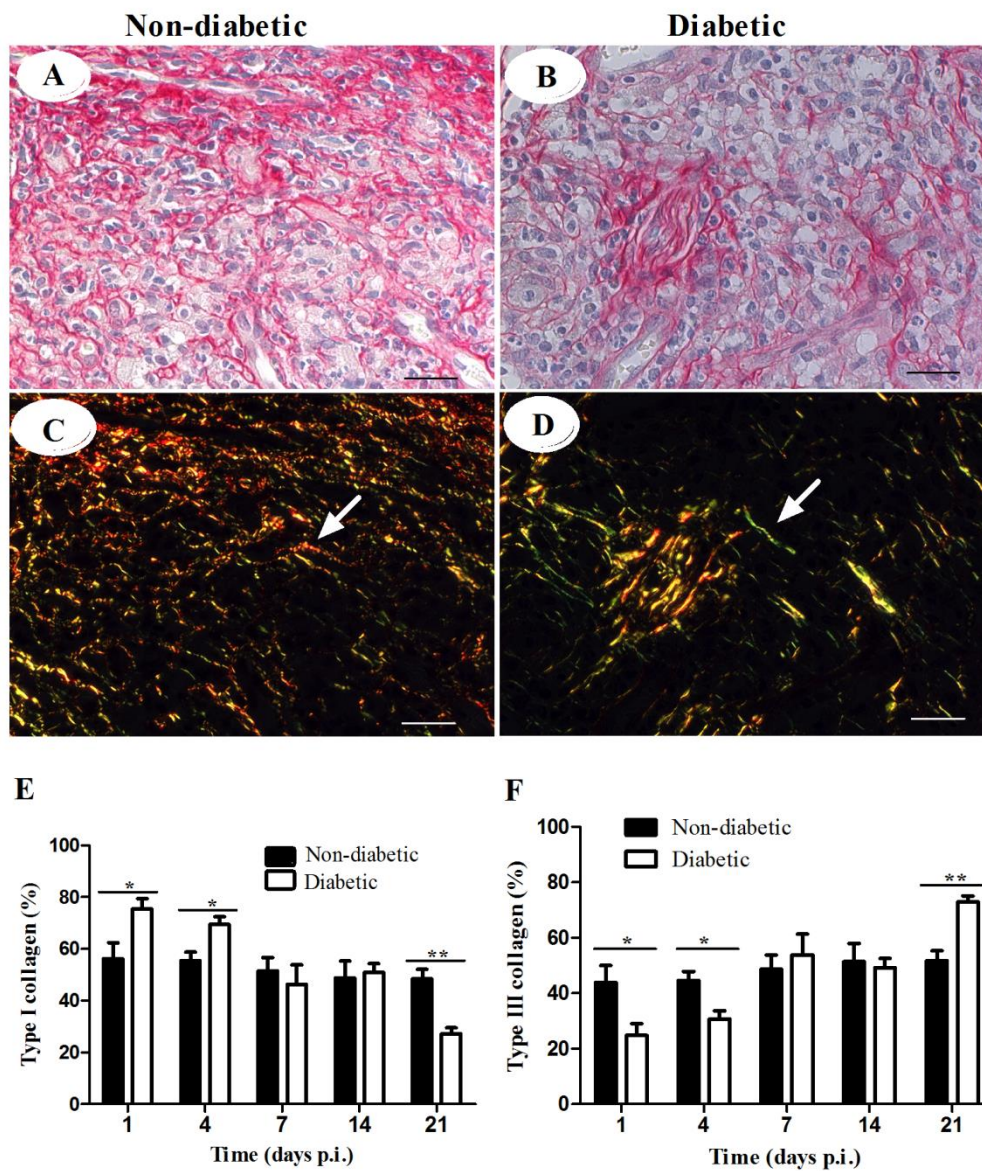
**Fig.1.** Skin from non-diabetic and diabetic mice infected with *C. albicans* during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days. (A) predominance of yeast cells (arrow); (B) higher burden load of hyphal forms (arrow); (C) reduced number of yeast cells (arrow); (D) disorganized tissue with rupture of dermis and presence of hyphae (arrow); (E) few yeast cells; (F) degradation of extracellular matrix, presence of hyphae (arrow); (G) small alterations of dermis; (H) disorganization of dermal tissue, note presence of filamentous forms (arrow); (I) absence of fungus; (J) absence of fungus. Stain: Periodic Acid Schiff (PAS). Scale bar: 25  $\mu$ m.



**Fig.2.** Population density of F4/80 and M2 macrophages in non-diabetic and diabetic mice infected with *C. albicans* during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days. (**A and B**) F4/80 macrophages at 21 days post infection (head arrow). (**C and D**) M2 macrophages at 21 days post infection (head arrow). (**E and F**) absolute number of F4/80 and M2 macrophages during the infection process. *Student t Test*, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig.3.** Antiinflammatory cytokines profile of non-diabetic and diabetic mice infected with *C. albicans* during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days. (A) IL-4; (B) IL-13; (C) TGF- $\beta$ ; (D) IL-10. One way ANOVA, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig.4.** Collagen profile in skin of non-diabetic and diabetic mice infected with *C. albicans* during 5 point-time: 1, 4, 7, 14 and 21 days. (**A and B**) collagen fibers under non polarized light at 21 days post infection. Observe few collagen in diabetic mice. (**C and D**) collagen fibers under polarized light at 21 days post infection. Observe few collagen type I fibers stained in red (arrow) and higher number of collagen type III stained in green (arrow). (**E and F**) relative number of collagen type I and III observed during the infection process. Stain: Picrosirius red. Scale bar 25  $\mu$ m. Student t Test, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ O DM provocou uma resposta imune retardada e deficiente frente a infecção causada por *C. albicans*.
- ✓ O sistema imune de camundongos diabéticos foi capaz de eliminar completamente *C. albicans* e iniciar o processo de cicatrização, porém de forma atrasada.
- ✓ Nos camundongos não diabéticos, observou-se predomínio de leveduras e a presença do fungo até 7 dias; nos diabéticos houve predomínio de formas filamentosas e o fungo foi detectado até 14 dias pós infecção.
- ✓ O DM prejudicou o recrutamento de macrófagos para o local da lesão, já que estavam em menor densidade populacional durante o curso da infecção.
- ✓ A ativação alternativa de macrófagos (M2) foi prejudicada e atrasada nos camundongos diabéticos, e essa ativação ocorreu sob a ação de exclusiva de IL-13.
- ✓ A presença de IL-13 na transição de M1 para M2 exibiu um papel crítico para o processo de remodelamento do tecido lesionado nos camundongos diabéticos.
- ✓ Citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e especialmente o TGF- $\beta$ , surgiram de forma tardia nos camundongos diabéticos, prejudicando assim o processo de cicatrização.
- ✓ O DM alterou o padrão de remodelamento do tecido conjuntivo durante todo o curso da infecção. Observou-se a depleção de colágeno tipo I. Por outro lado, colágeno de tipo III estava aumentado, possivelmente como um mecanismo de compensação.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Aprovação Comitê de Ética



Universidade  
Estadual de Londrina

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 188/12

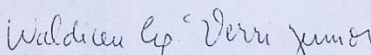
Londrina, 15 de agosto de 2012

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 03 de Julho de 2012 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Candidíase cutânea em camundongos diabéticos e efeito da concanavalina A com fins terapêuticos" processo CEUA nº 10753.2012.24, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados conforme seu ofício de 17 de julho de 2012, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 320 camundongos Balb/c fêmeas com idade entre 60-90 dias, com procedência do Biotério da USP Ribeirão Preto. O projeto terá o objetivo de estabelecer as lesões cutâneas em camundongos diabéticos e usar concanavalina A com fins terapêuticos. Os camundongos serão tratados com aloxana para indução de diabetes e serão infectados com *Cândida albicans* na pata traseira, nos grupos do tratamento com concanavalina A (conA) receberão a conA junto com a *Cândida albicans*. Os grupos serão 1) grupo: haverá o estabelecimento da lesão, sub grupos de 1,2,3,7,14 e 21 dias; no 2) os animais de controle com lesão cutânea por *C. albicans* por 3 dias; 3) grupo os animais de controle com lesão cutânea por *Cândida* serão pós-tratados por 3 dias com concanavalina A (2.5;5.0;7.5; e 10µg). O efeito de cada dose deverá ser analisado após 1,2 e 3 dias; 4) grupo animais diabéticos com lesão cutânea por *C. albicans* por 3 dias e pós-tratamento com concanavalina A (2.5, 5.0, 7.5, e 10). Os camundongos serão avaliados diariamente para a presença de nódulo, úlceras, eritema e crostas, ambos em grupos serão avaliados também por um avaliador "cego" para o genótipo dos camundongos. Três dias após a infecção, será realizada uma biópsia de 4 mm no centro dos nódulos da *C. albicans* e serão fixadas em formalina e emblocadas em parafina e corados por hematoxilina-eosina. Os camundongos inoculados na pata direita traseira com  $5 \times 10^5$  pseudohifa serão sacrificados após três dias e as biópsias pesadas e então homogeneizadas. Os tecidos infectados, linfonodo popliteo e inguinal serão homogeneizadas mecanicamente por 1 min. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 36 meses.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

  
 Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verriz Junior  
 Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Ionice Felipe  
 Coordenadora do Projeto  
 Departamento de Ciências Patológicas  
 Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra Egle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG) e Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL)

## ANEXO B

## Comprovante de Submissão

## Medical Microbiology and Immunology

Infection and tissue repair of experimental cutaneous candidiasis in diabetic mice.  
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Infection and tissue repair of experimental cutaneous candidiasis in diabetic mice.
Article Type:	Original Article
Keywords:	experimental cutaneous candidiasis; diabetes-induced by alloxan; M1 and M2 macrophages; collagen type I and III; antiinflammatory cytokines.
Corresponding Author:	Ionice Felipe, Professor State University of Londrina Londrina, PR BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	State University of Londrina
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Andréia Carla Eugenio Pupim, Msc Student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Andréia Carla Eugenio Pupim, Msc Student Taciê Graminha Campois, Professor Eduardo José de Almeida Araújo, Professor Terezinha Inez Estivalet Svidizinski, Professor Ionice Felipe, Professor
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Fundação Araucária (298/2012)      PhD Ionice Felipe
Abstract:	<p>Diabetic patients seem to be predisposed to cutaneous candidiasis, and given the high complexity of this disease, the mechanisms of effector molecules and cells that participate in the immune response merit better understanding. In a previous study, we used an experimental model of cutaneous candidiasis in immunocompetent BALB/c mice, where we demonstrated a balance between inflammatory and antiinflammatory cytokines, allowing the elimination of pathogens and cure of the disease. Here, the mice were treated with alloxan by the endovenous route and all animals with blood glucose levels &gt;250 mg/dL received <i>Candida albicans</i> intradermally in the hind paw and were studied up to 21 days. Control groups were not treated with alloxan and underwent the same procedures. We evaluated the interference of diabetic conditions in alloxan-induced diabetic mice in relation to the development of <i>C. albicans</i> infection, density of macrophages, distribution of collagen type I and III, antiinflammatory cytokines involved in the transition of M1 to M2 macrophages and tissue repair, compared with non-diabetic mice. Diabetic mice showed a significant decrease in the density of F4/80 macrophages, as well delayed elimination of <i>C. albicans</i>. Differentiation to M2 macrophages was late and activated by IL-13 and TGF-<math>\beta</math>, while IL-4 production was significantly lower (<math>p &lt; 0.001</math>) compared to control. There was significant (<math>p &lt; 0.01</math>) loss of collagen type I, as compared to non-diabetic mice, and collagen type III was produced late with interference of IL-13 and TGF-<math>\beta</math> production. These findings can be useful in understanding the mechanisms involved in chronic cutaneous candidiasis.</p>

## ANEXO C

### Instructions for Authors

Medical Microbiology and Immunology publishes articles on all aspects of the interrelationship between infectious agents and their hosts.

The journal publishes Original Investigations, Reviews, Rapid Communications, and Editorials.

Material submitted to MMI must be arranged as follows (except for Editorials):

- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgement(s)
- References
- Figure legends
- Tables

Special Issues

- Contributions that are part of a Special Issue must include the following footnote on the title page:

"This article is published as part of the Special Issue on [title of the Special Issue]"

### MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

#### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

#### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## TEXT

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.
- Genus and species names should be in italics.
- The common names of animals should not be capitalized.

## REFERENCES

### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8  
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:  
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI  
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

## TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

### Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

#### Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

#### Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

#### Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

#### Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

## ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial),

informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

## DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

## RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

### 1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

### 2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

## INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

**Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

## DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- Edanz Editing Global

## AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement

online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

- Springer Open Choice

#### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

#### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

#### Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

#### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

#### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.