



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

JÚNIA OLIVEIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Streptococcus mutans*
SOBRE FORMAÇÃO DE BIOFILME E MORFOGÊNESE DE
Candida albicans in vitro E ESTUDO EXPERIMENTAL EM
*Galleria mellonella***

2014

JÚNIA OLIVEIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Streptococcus mutans* SOBRE
FORMAÇÃO DE BIOFILME E MORFOGÊNESE DE *Candida albicans*
in vitro E ESTUDO EXPERIMENTAL EM *Galleria mellonella***

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia/ Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. ampl. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

V711i Barbosa, Júnia Oliveira
Avaliação dos efeitos de *Streptococcus mutans* sobre formação de biofilme e
morfogênese de *Candida albicans in vitro* e estudo experimental em *Galleria
mellonella* / Júnia Oliveira Barbosa - São José dos Campos: [s.n.], 2014.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

1. *Candida albicans* 2. *Streptococcus mutans* 3. Biofilmes. I. Junqueira, Juliana
Campos. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

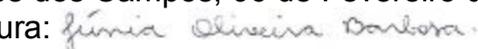
tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 06 de Fevereiro de 2014.

Assinatura: 

E-mail: juniabarbosa@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Dra. Líliliana Scorzoni

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de Araraquara

São José dos Campos, 06 de Fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

A Deus, acima de tudo e de todos,

Por todas as oportunidades que tem colocado em meu caminho, por me permitir vencer os desafios e por não me deixar desanimar nunca.

Aos meus pais Ana Maria e Donizete, pelo amor incondicional, pela formação e apoio constante em todas minhas decisões.

"A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade, não bastaria um simples obrigado, a vocês que iluminaram os caminhos escuros com afeto e dedicação para que trilhasse sem medo e cheios de esperança, não bastaria um simples muito obrigado, a vocês que se doaram por inteiro e renunciaram ao seus sonhos, para que muitas vezes pudesse realizar o meu, pela longa espera e compreensão durante anos de espera até um novo reencontro, não bastaria um muitíssimo obrigado, a vocês pais por natureza, opção e amor não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo." (Autor desconhecido).

Ao meu marido Rodrigo

Pela eterna paciência, compreensão e colaboração durante o desenvolvimento do Mestrado. Obrigada por me amar, acreditar em mim e incentivar meus sonhos.

Aos meus irmãos Rildo e Sarah

Meus maiores admiradores... São vocês que sempre me motivam a seguir em frente. A vocês meu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha querida orientadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Agradeço por toda paciência, apoio, confiança e ensinamentos que foram essenciais na minha formação. Agradeço por todos estes anos de convívio, pelas oportunidades, amizade e dedicação. A minha eterna gratidão, respeito e admiração.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Agradeço por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia, possibilitando meu desenvolvimento. Seus valores, ensinamentos e palavras de incentivo sempre serão lembrados. Expresso aqui minha gratidão e admiração pelo exemplo de profissional que você é.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos

Agradeço o ICT, na pessoa do Diretor Prof. Carlos Augusto Pavanelli e do Vice-diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal

Representado pela Coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e Vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, pela oportunidade e suporte para desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de Fevereiro à Outubro de 2012.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Pela concessão da Bolsa de Mestrado (processo nº 2012/15262-8) no período de Novembro de 2012 à Janeiro de 2014 e Auxílio à Pesquisa – Regular (processo nº 2012/19915-6).

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal

Obrigada por todos ensinamentos e pela contribuição diária na minha formação profissional.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Na pessoa da pesquisadora Márcia Prata, pelo envio das lagartas de *G. mellonella* sem as quais este trabalho não seria possível.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia

Em especial, Rodnei, Patrícia e Simone, obrigada por todos momentos que passamos juntos, pela convivência agradável, amizade e trocas de experiência e aprendizado que tanto nos enriqueceram. Conhecer e trabalhar com vocês foi um grande privilégio.

À aluna de Iniciação Científica Janaína Araújo de Alvarenga

Obrigada pela oportunidade de aprendermos juntas, pela amizade, dedicação e carinho. Sem sua ajuda não seria possível realizar este trabalho com êxito.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio e Domingos

Agradeço por toda ajuda ao longo destes anos, vocês foram essenciais para a qualidade da minha pesquisa.

Ao Laboratório de Apoio à Pesquisa

Na pessoa da Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, pela disponibilidade do espaço para preparo das lâminas histológicas.

Ao técnico do Laboratório de Patologia, Walter Cruz

Agradeço pela ajuda imprescindível na preparação dos cortes histológicos utilizados neste trabalho.

A todos os funcionários do ICT-UNESP

Agradeço especialmente aos **funcionários da Seção da Pós Graduação** Rosemary, Bruno, Erena e Ivan pela atenção, compreensão e por todos serviços prestados.

Agradeço a todos que participaram e ajudaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 <i>Candida</i> spp.	16
2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	19
2.3 Biofilme e interação microbiana.....	22
2.4 <i>Galleria mellonella</i>	27
3 PROPOSIÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Cepas de Micro-organismos.....	33
4.2 Interação entre <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> em modelos <i>in vitro</i>	33
4.2.1 Grupos experimentais.....	33
4.2.2 Estudo dos efeitos de <i>S. mutans</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	35
4.2.2.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	35
4.2.2.2 Preparo do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	36
4.2.2.3 Formação dos biofilmes	36
4.2.2.4 Determinação do número de UFC/mL.....	37
4.2.2.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38
4.2.3 Estudo dos efeitos de <i>S. mutans</i> sobre filamentação de <i>C. albicans</i>	38
4.3 Interação entre <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	40

4.3.1 Grupos experimentais	40
4.3.2 <i>Galleria mellonella</i>	41
4.3.3 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>S. mutans</i>	42
4.3.4 Efeitos de <i>S. mutans</i> na candidose experimental em <i>G. mellonella</i>	42
4.3.4.1 Preparo das suspensões padronizadas de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	42
4.3.4.2 Injeção dos micro-organismos em <i>G. mellonella</i>	43
4.3.4.3 Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	44
4.3.4.4 Estudo da cultura da hemolinfa - Contagem de UFC/mL	44
4.3.4.5 Análise histológica de <i>G. mellonella</i>	45
4.4 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	49
5.1 Interação entre <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> em modelos <i>in vitro</i>	49
5.1.1 Efeitos de <i>S. mutans</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> - UFC/mL.....	49
5.1.2 Efeitos de <i>S. mutans</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>	51
5.1.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
5.2 Interação entre <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	56
5.2.1 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>S. mutans</i>	56
5.2.2 Determinação da curva de sobrevivência da <i>G. mellonella</i>	57
5.2.3 Estudo de cultura de hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	58
5.2.4 Análise histológica de <i>G. mellonella</i>	60
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	72
8 REFERÊNCIAS	73

Barbosa JO. Avaliação dos efeitos de *Streptococcus mutans* sobre formação de biofilme e morfogênese de *Candida albicans in vitro* e estudo experimental em *Galleria mellonella* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

As interações entre fungos e bactérias estão presentes na natureza e tem grande importância médica e ambiental. O desenvolvimento adequado de modelos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar essas interações é essencial para o entendimento da patogênese das doenças e descoberta de novas estratégias terapêuticas. O objetivo desse estudo foi avaliar as interações microbianas entre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em modelos de biofilmes formados *in vitro* e em modelo experimental de *Galleria mellonella*. No estudo *in vitro*, foram avaliados os efeitos de *S. mutans* sobre a formação de biofilme por *C. albicans* e sobre a capacidade de filamentação de *C. albicans*. Em ambos os testes, foram avaliados os efeitos diretos das células de *S. mutans* sobre *C. albicans* e também os efeitos indiretos de *S. mutans* sobre *C. albicans*, utilizando apenas o sobrenadante da sua cultura. Além disso, foram testados os efeitos de *S. mutans* sobre *C. albicans* em diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana (4, 6, 18 e 24 h). Para a realização do estudo *in vivo*, pela primeira vez na literatura, foram inoculados *S. mutans* juntamente com *C. albicans* em lagartas de *G. mellonella* para indução de infecção experimental. Os efeitos de *S. mutans* sobre a candidose experimental em *G. mellonella* foram avaliados pela análise da curva de sobrevivência, pelo estudo da cultura da hemolinfa para quantificação de *C. albicans* e através da avaliação histológica da presença de hifas de *C. albicans* nos tecidos do hospedeiro. Os resultados dos testes *in vitro* e da contagem de UFC/mL em *G. mellonella* foram submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey. Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisados pelo método de Log-rank. Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5%. Os resultados *in vitro* demonstraram que as células de *S. mutans* favoreceram a formação de biofilme por *C. albicans*, entretanto quando *C. albicans* foi colocada em contato apenas com o sobrenadante da cultura de *S. mutans*, houve redução na formação do biofilme e inibição da transição morfológica de *C. albicans*. No estudo *in*

vivo, verificou-se que a injeção de *S. mutans* em lagartas previamente infectadas por *C. albicans* aumentou significativamente a sobrevivência destes animais. Além disso, houve redução da carga fúngica presente na hemolinfa das lagartas quando *C. albicans* foi associada com *S. mutans*, bem como redução da formação de hifas nos tecidos das lagartas quando *C. albicans* esteve associada apenas com o sobrenadante da cultura de *S. mutans*. Através dos resultados obtidos, concluiu-se que *S. mutans* secretam subprodutos no meio de cultura que apresentam efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, interferindo na sua capacidade de filamentação e formação de biofilme *in vitro*. A inoculação de *S. mutans* em lagartas de *G. mellonella* diminuiu a patogenicidade de *C. albicans* nestes animais, demonstrando que *G. mellonella* constitui um modelo adequado para estudo das interações entre *C. albicans* e *S. mutans*.

Palavras-chave: *C. albicans*. *S. mutans*. Biofilmes.

Barbosa JO. Evaluation of the effects of Streptococcus mutans on biofilm formation and morphogenesis of Candida albicans in vitro and experimental study in Galleria mellonella [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Interactions between fungi and bacteria are present in nature and has great medical and environmental importance. The development of adequate models in vitro and in vivo to characterize these interactions are essential for understanding the pathogenesis of diseases and discovery of new therapeutic strategies. The aim of this study was to evaluate the microbial interactions between Streptococcus mutans and Candida albicans in vitro and in an experimental model of Galleria mellonella. In the in vitro study, the effects of S. mutans on biofilm formation and on the filamentation ability by C. albicans were evaluated. On both tests, we evaluated the direct effects of S. mutans cells and indirect effects of the supernatant culture of S. mutans on C. albicans. Furthermore, the effects of the S. mutans were tested on C. albicans at different stages of growth of the bacterial culture (4, 6, 18 and 24 h). In vivo study, were inoculated S. mutans together with C. albicans in larvae of G. mellonella for induction of experimental infection. The effects of S. mutans on experimental candidiasis in G. mellonella was evaluated by analysis of the survival curve, the study of the culture of hemolymph for quantification of C. albicans and by histological evaluation the formation of hyphae of C. albicans in the host tissues. The results of in vitro tests and number of CFU/mL in G. mellonella were submitted to ANOVA and Tukey's test. The data obtained in the survival of G. mellonella were analyzed using the log-rank test. In all tests, were adopted significance level 5%. In vitro results showed that cells of S. mutans favored biofilm formation by C. albicans, however when C. albicans was put in contact with the only supernatant of a culture of S. mutans, there was a reduction in biofilm formation and inhibition of the morphological transition of C. albicans. In the in vivo study, it was found that the injection of S. mutans in larvae previously infected by C. albicans significantly increased the survival of these animals. In addition, the fungal load present in the hemolymph of G. mellonella was reduced when C. albicans was associated with S. mutans, as well caused a reduction in the formation of hyphae in tissues of larvae when C. albicans was associated only with the culture supernatant of S. mutans. From the results it was concluded that S. mutans

secreted by products into culture medium that have inhibitory effects on C. albicans, interfering in their ability to filamentation and biofilm formation in vitro. Inoculation of S. mutans in G. mellonella larvae reduced the pathogenicity of C. albicans in these animals, showing that G. mellonella is a suitable model for the study of interactions between C. albicans and S. mutans.

Keywords: C. albicans. S. mutans. Biofilms.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que encontram-se organizadas em biofilmes (Jarosz et al., 2009). Uma das características mais interessantes do biofilme é a sua ampla variedade de espécies, assim como interações existentes entre elas (Shirtliff et al., 2009; Thein et al., 2009). Nas interações microbianas, bactérias e fungos podem influenciar uns aos outros pela secreção de moléculas extracelulares de sinalização ou por interações físicas de contato celular ou agregação (Peleg et al., 2010). Sendo assim, as relações ecológicas entre leveduras do gênero *Candida* com as diferentes espécies bacterianas na cavidade bucal tem se tornado objeto de interesse em várias pesquisas científicas.

A interação de bactérias com leveduras e hifas em biofilmes tem sido associada com redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas por bactérias, pela transferência direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes. Outro mecanismo de interação entre bactérias e fungos é a modificação nas condições ambientais, como a mudança no pH, que pode influenciar a formação de hifas por *C. albicans*. Além das interações antagônicas, interações mutuamente benéficas em biofilmes mistos também tem sido observadas, nas quais as diferentes espécies podem fornecer proteção uma para outra contra o sistema imunológico ou aos agentes antimicrobianos (Peleg et al., 2010).

Na tentativa de elucidar os fenômenos destas interações microbianas, principalmente em relação aos mecanismos de aderência aos tecidos bucais, estabelecimento de co-agregações e diferenças nas atividades metabólicas dos micro-organismos bucais,

muitos modelos de biofilmes heterotípicos *in vitro* foram utilizados, mas há uma necessidade do desenvolvimento de estudos *in vivo* a fim de caracterizar as relações presentes nas interações entre fungos e bactérias

Recentemente, modelos de estudo em animais invertebrados tem sido muito utilizados para avaliar a patogenicidade de micro-organismos de interesse médico-odontológico, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, entre outros. Entre os invertebrados, *G. mellonella* mostrou ser um modelo confiável no estudo da patogenicidade das leveduras do gênero *Candida*, bem como no desenvolvimento da candidose experimental e no tratamento dessas infecções (Fuchs et al., 2010; Junqueira et al., 2011).

Apesar de *G. mellonella* apresentar grande utilidade para o estudo da patogenicidade de micro-organismos, interações microbianas e descoberta de novos agentes antimicrobianos (Coleman et al., 2010), não existem trabalhos na literatura que estudaram a interação de micro-organismos bucais em modelos de invertebrados. Sendo assim, o objetivo desse estudo será avaliar os efeitos de *Streptococcus mutans* sobre formação de biofilme e morfogênese de *Candida albicans in vitro* e sobre a candidose experimental em *Galleria mellonella*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida* spp.

A maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos é causada por fungos oportunistas. *Candida* spp. é um fungo diplóide e polimórfico responsável pelo desenvolvimento de várias patologias (Lima et al., 2004; Kuleta et al., 2009). Em condições normais, este fungo está presente nos humanos como um organismo comensal colonizando superfícies mucosas da cavidade bucal, trato gastrointestinal e trato genitourinário, sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais à sua saúde (Cardoso, 2004), mas torna-se patogênico quando a imunidade do hospedeiro é prejudicada (Samaranayake et al., 2000; Van de Veerdonk et al., 2010).

A candidose se manifesta quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos, modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota residente, ou seja, a relação de comensal é dependente da integridade do tecido, da microbiota e do sistema imune do hospedeiro. Neste caso a candidose pode ser localizada, determinando sintomatologia restrita a essa área, ou pode ser sistêmica (Colombo, Guimarães, 2003; Soll et al., 2003; Pfaller, Diekema, 2007; Jouault et al., 2009; de Rossi et al., 2011). As infecções disseminadas podem ser letais com alta taxa de morbidade e mortalidade (40 a 60%), sendo que a candidose está em quarto lugar entre os principais tipos de infecções nosocomiais (Wenzel, Gennings, 2005).

Existem algumas propriedades inerentes às células de *Candida*, denominadas fatores de virulência, que lhes conferem a

capacidade de produzir doença, tais como: 1) aderência às células do hospedeiro por adesinas como as codificadas pela família de genes ALS (agglutinin-like sequence) (Calderone, Fonzi, 2001); 2) morfogênese ou dimorfismo fúngico representado pela formação de leveduras, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidoconídios (Calderone, Fonzi, 2001; Sudbery et al., 2004; Biswas et al., 2007); 3) resistência ao sistema imune do hospedeiro por mecanismos de sobrevivência dentro de fagócitos (Jong et al., 2001); 4) capacidade de modulação do sistema imune, pois mananas e manoproteínas de *Candida* são capazes de regular (ativar e desativar) a ação das defesas do hospedeiro (Chaffin et al., 1998); 5) adaptação ao ambiente oxidativo, determinada pelo genoma de *C. albicans*, em que genes são temporariamente induzidos ou reprimidos em função do óxido nítrico (Hromatka et al., 2005); 6) sequestro de ferro, principalmente na candidose hematogênica, em que *C. albicans* é capaz de adquirir o ferro a partir da transferrina (Knight et al., 2005); 7) adequação à variação de temperatura e pH, permitindo a adaptação de *Candida* à diferentes sítios no hospedeiro; 8) produção de toxinas (Buzzini, Martini, 2011); e 9) produção de enzimas hidrolíticas, sendo as principais, proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos (Calderone, Fonzi, 2001).

As alterações morfológicas de *C. albicans* são desencadeadas por vários fatores ambientais, incluindo crescimento em soro, N-acetilglicosamina, pH do ambiente acima de 6,5, baixo teor de O₂ e concentrações elevadas de CO₂, temperaturas acima de 37°C, falta de nutrientes e aderência (Klengel et al., 2005; Biswas et al., 2007; Brown et al., 2002; Cottier, Muhlschlegel, 2009). Segundo Kuleta et al. (2009), as mudanças fenotípicas de *C. albicans* são condições importantes para o processo de invasão ao hospedeiro, tornando o fungo mais virulento durante os processos infecciosos.

A presença de hifas possibilita *C. albicans* escapar da defesa do hospedeiro através do aumento de sua aderência às superfícies

colonizadas, facilitando a invasão dos tecidos epiteliais que resulta em danos teciduais (Masuoka, 2004; Williams, Lewis, 2011). As hifas também são essenciais para a formação de biofilmes espessos, bem como as interações célula-substrato e célula-célula, e a produção de matriz extracelular, que são passos importantes para o desenvolvimento do biofilme (Blankeship, Mitchell, 2006; d'Enfert, 2006).

Biofilmes de *Candida* são altamente resistentes a tratamentos com antifúngicos convencionais e estão presentes em vários dispositivos implantados, tais como cateteres vasculares e próteses dentárias, que servem de reservatórios para infecções fúngicas persistentes. Estima-se que 80% das infecções estão associadas à formação de biofilme (Dongari - Bagtzoglou, 2008). Portanto, agentes que levem a reduções no desenvolvimento de hifas podem representar medidas eficazes e tangíveis para reduzir a patogênese de *C. albicans*, em consonância com o atual paradigma de antifúngico voltado para agir sobre características de virulência em vez da erradicação microbiana (Gauwerky et al., 2009).

Martins et al. (2007) estudaram o efeito de sobrenadantes obtidos a partir de culturas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* sobre as alterações morfológicas dessas espécies. Primeiramente foi realizado cromatografia gasosa para identificar os componentes presentes no sobrenadante e a seguir, testaram o efeito das substâncias isoladas sobre culturas planctônicas e biofilmes formados por ambas espécies, observando que os componentes testados reduziram em até 50% a formação de hifas, concluindo que as moléculas de sinalização secretadas por estas espécies de *Candida* interferem nas interações inter e intra-espécies de *Candida*.

Sabe-se que a estomatite protética é provocada por espécies de *Candida* associadas à diferentes bactérias, incluindo *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella*. A queilite angular também é uma infecção oral de etiologia mista, na qual *C. albicans* está associada à *S. aureus*,

Streptococcus, *Enterococcus*, *E. coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*. Na periodontite, *Candida* coexiste com outros micro-organismos do biofilme dentário, como *Staphylococcus*, bacilos entéricos, *Pseudomonas* e vários micro-organismos anaeróbios (Thein et al., 2009).

A presença de *C. albicans* também tem sido demonstrada em lesões cariosas já estabelecidas (Nikawa et al., 2003). A hipótese da inter-relação entre *S. mutans* e *C. albicans* baseia-se em seus mecanismos de virulência e características bioquímicas, associados a fatores endógenos e exógenos que propiciem ao hospedeiro um ambiente bucal que favoreça a atuação dos dois micro-organismos (Ates et al., 2005).

Barbieri et al. (2007) avaliaram *in vitro* a capacidade da aderência de cepas de *S. mutans* e *C. albicans* de forma isolada ou em associação, mostrando que esses micro-organismos quando juntos, apresentaram maior aderência à superfície dentária, formando uma relação de mutualismo, sugerindo que a presença de *C. albicans* pode ser um agravante para o risco à doença cárie.

Além da associação com *S. mutans*, *C. albicans* é encontrada no biofilme supragengival juntamente com *S. oralis*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Filoche et al., 2010), apresentando participação no desenvolvimento da cárie dentária (Gregoire, 2011; Klinke et al., 2011). Entretanto, o papel de *C. albicans* na co-agregação com esses micro-organismos durante a aderência microbiana na superfície dentária ainda está sendo motivo de investigação (Takahashi, Nyvard, 2011).

2.2 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans são bactérias Gram-positivas, medem cerca de 0,5 a 0,75 µm de diâmetro, agrupados aos pares ou em

cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. Em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas, fortemente aderidas ao meio de cultura, e com bordas irregulares (Gold et al., 1973).

S. mutans é um importante patógeno oral que está presente na maioria da população humana do mundo (Becker et al., 2002; Mitchell, 2003). Esta bactéria habita o biofilme formado na superfície do dente e contribui para o início e progressão de doenças relacionadas com o biofilme, variando em severidade da cárie dentária para endocardite bacteriana sub-aguda (Lemos, Burne, 2008).

A capacidade de *S. mutans* se aderir nas superfícies dentárias e iniciar a formação do biofilme (Barbieri et al., 2007), gerar ácidos orgânicos e tolerar ambientes ácidos, contribui para seu potencial cariogênico e confere uma vantagem ecológica na competição com outras espécies de bactérias orais e fungos (Banas, 2004; Napimoga et al., 2005; Kuramitsu et al., 2007; Pereira-Cenci et al., 2008; Vilchez et al., 2010).

Devido ao seu sistema metabólico, *S. mutans* propiciam um nicho acidogênico que extrapola a capacidade tampão da saliva, desencadeando alterações na camada mineral da superfície dentária e provocando a desmineralização progressiva que inicia o processo cariioso (Grönroos, 2000). Segundo Takahashi e Nyvard (2011), o processo de formação da cárie dentária consiste de 3 estágios: (1) a microbiota residente da superfície do esmalte, formada por *Streptococcus* não *mutans* e *Actinomyces*, promove uma acidificação leve no biofilme que é compatível com o equilíbrio de desmineralização e remineralização do esmalte, (2) quando o açúcar é consumido constantemente, a acidificação do biofilme se torna moderada e frequente, o que resulta na seleção de cepas de *Streptococcus* não *mutans* com maior capacidade acidogênica e acidúrica. Essa população de cepas de *Streptococcus* não *mutans* geneticamente adaptadas são denominadas *Streptococcus* não *mutans* de

baixo pH e são responsáveis pelo desequilíbrio do processo de desmineralização e remineralização, levando a perda de mineral do esmalte (fase acidogênica), (3) em condições acidúricas severas, *S. mutans* e *Lactobacillus*, bem como outras cepas acidúricas de *Streptococcus*, *Actinomyces*, bifidobactéria e *Candida* tornam-se predominantes (fase acidúrica), assumindo um papel importante na progressão da cárie dentária.

É conhecido que *S. mutans* também é capaz de atingir a corrente sanguínea, causando bacteriemias transientes que podem resultar no desenvolvimento de endocardite infecciosa (Moreillon, Que, 2004). *S. mutans* são classificados em quatro sorotipos (*c*, *e*, *f* e *K*) de acordo com a especificidade sorológica definida pelo polissacarídeo glucose-ramnose (RGP) na parede celular (Nakano et al., 2004; Huang et al., 2008).

Nakano et al. (2006) relataram que *S. mutans* foi a espécie mais prevalente entre as bactérias detectadas em válvulas cardíacas doentes, bem como em placas de ateroma, com uma incidência de 68,6 e 74,1%, respectivamente. Além disso, Kozarov et al. (2005), recuperaram DNA de *S. mutans* a partir de placas de ateroma em 22,5% dos pacientes jovens (~27 anos) e 44,4% dos pacientes idosos (~67 anos).

Em um estudo com pacientes que foram submetidos a cirurgias cardiovasculares, demonstrou-se que o sorotipo *e* de *S. mutans* foi prevalente na placa dental e em amostras de pacientes com doenças cardiovasculares, enquanto as cepas do sorotipo *c*, que é o sorotipo mais comum encontrado na placa dentária, prevaleceu no grupo controle (Nakano et al., 2007). Estes resultados dão credibilidade a idéia de que há subpopulações de *S. mutans* colonizando os seres humanos, que, embora não necessariamente estejam associadas com a cárie, possuem capacidade de interagir e possivelmente invadir as células do sistema cardiovascular.

Na cavidade oral, células bacterianas residem em uma comunidade microbiana diversa, abundante e complexa, onde os micro-

organismos estão envolvidos em uma ampla gama de interações físicas, metabólicas e moleculares. Essas interações podem ser essenciais para a aderência, crescimento e a sobrevivência de espécies bacterianas em um local, permitindo que estes micro-organismos resistam em ambientes hostis (Marsh, 2005; Machado et al., 2012).

Foi demonstrado que para manter seu nicho, *S. mutans* inibe outras espécies microbianas através de competição, produzindo um peptídeo regulador chamado mutacina (Kreth et al., 2006). Estudos genéticos em diferentes isolados de *S. mutans* mostraram uma enorme diversidade de genes relacionados com a comunicação interespecie (Bekal-Si Ali et al., 2002; Klein et al., 2006) e produção de mutacina (Kamiya et al., 2008).

2.3 Biofilme e interação microbiana

Recentemente, tem sido estimado que 65% das infecções humanas estão associadas com a formação de biofilmes nas superfícies dos tecidos ou dispositivos médicos (Uppuluri et al., 2009). Nos biofilmes, bactérias e fungos estabelecem relações ecológicas que podem apresentar grande importância clínica. Essas interações são altamente complexas e dependem das condições ambientais, dos patógenos e dos fatores do hospedeiro (Peleg et al., 2010).

Os biofilmes são estruturas tridimensionais de comunidades microbianas aderidas a uma superfície sólida, como esmalte dentário, superfície radicular ou implantes dentários (Zijngue, 2010). No biofilme, os micro-organismos apresentam-se embebidos em uma matriz extracelular composta por glicoproteínas e polissacarídeos (ten Cate et al., 2009).

A elucidação dos mecanismos de interação entre diferentes espécies microbianas inseridas na mesma comunidade é extremamente importante para a compreensão das doenças infecciosas e para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos, visto que o poder dessas interações microbianas foi demonstrado, historicamente, com a identificação da penicilina, como consequência da interação entre bactérias e fungos em uma cultura bacteriana contaminada por *Penicillium* (Peleg et al., 2010).

Apesar da abundante interação entre fungos e bactérias na natureza, nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares que determinam essas interações e sua importância na saúde humana ainda é escasso. Os micro-organismos possuem mecanismos complexos para garantir sua sobrevivência, que os defendem não apenas das condições ambientais adversas, mas também contra micro-organismos competidores.

Interações entre *C. albicans* e bactérias podem afetar a sobrevivência do hospedeiro, seja através da competitividade ou da morfogênese (Peleg et al., 2010). Estas interações podem promover ou prevenir doenças em nichos co-habitado por *C. albicans* e bactérias (Morales, Hogan, 2010) e tem sido associadas com redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas por bactérias, pela transferência direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes. Outro mecanismo de interação entre bactérias e fungos é a modificação nas condições ambientais, como a mudança no pH, que pode influenciar a formação de hifas por *C. albicans*. Além das interações antagônicas, interações mutuamente benéficas em biofilmes mistos também tem sido observadas, nas quais as diferentes espécies podem fornecer proteção uma para outra contra o sistema imunológico ou aos agentes antimicrobianos (Peleg et al., 2010).

Thein et al. (2006) avaliaram o efeito de oito espécies de bactérias comensais da cavidade oral sobre formação de biofilme *in vitro* por *C. albicans*. As bactérias orais estudadas foram *Actinomyces israelii*,

Lactobacillus acidophilus, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus intermedius*. Co-cultura de *C. albicans* com cada uma destas bactérias resultaram em uma redução consistente na formação do biofilme de *Candida*, exceto para *L. acidophilus*, *S. mutans* e *S. intermedius*, concluindo que a natureza quantitativa e qualitativa das bactérias modula a formação de biofilmes de *C. albicans* em ambientes de espécies mistas, como a cavidade oral.

Embora exista uma grande quantidade de estudos sobre os meios em que as bactérias e os fungos são capazes de interagir com outros micro-organismos (Jakubovics, 2010; Kolenbrander et al., 2010; Crawford, Clardy, 2011), na maioria das vezes, as biomoléculas responsáveis por influenciar estes processos biológicos permanecem desconhecidas. Estas apresentam um papel vital nas relações intra e interespecies envolvendo fungos e bactérias humanas (Zimmermann, Fischbach, 2010; Sonnenburg, Fischbach, 2011; Yang et al., 2011). Foi relatado que *S. mutans* UA159 gera um único metabólito secundário, o mutanobactin A (Wu et al., 2010), que foi capaz de inibir a transição morfológica do patógeno *C. albicans* de levedura para a forma filamentosa (Joyner et al., 2010).

Pereira-Cenci et al. (2008) estudaram a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em biofilmes formados *in vitro* sobre diferentes substratos: hidroxapatita, polimetilmetacrilato (PMMA) e material de reembasamento protético *soft liner*. Em todas as condições testadas, a presença de *S. mutans* (UA 159) no biofilme aumentou o crescimento das leveduras de *C. albicans* (ATCC 90028), sugerindo que esses micro-organismos estabelecem uma relação de mutualismo, estimulando o crescimento de ambas as espécies e formando co-agregações que aumentam o processo de adesão, entretanto, esses autores verificaram que *S. mutans* suprimiu a formação de hifas por *C. albicans*.

A partir dos resultados desse estudo, Jarosz et al., (2009) avaliaram a interação entre *S. mutans* UA 159 e *C. albicans* em relação às moléculas de comunicação secretadas (*quorum-sensing*). *S. mutans* inibiu a formação de tubo germinativo por *C. albicans* em culturas mistas e até mesmo quando ele foi fisicamente separado de *C. albicans*. A inibição de tubos germinativos foi provocada apenas pelas culturas de *S. mutans* com crescimento de 4 h, sendo que culturas de 6, 8 e 24 h não tiveram efeito inibitório sobre *C. albicans*. Esses resultados indicam que *S. mutans* secretam moléculas capazes de inibir a formação de tubos germinativos por *C. albicans* apenas durante a fase inicial do crescimento exponencial de *S. mutans*.

Outra molécula de quorum-sensing secretada por *Streptococcus* spp., autoinducer 2 (AI-2) (Yoshida et al., 2005, Jarosz et al., 2009) tem sido implicada em interações nos biofilmes mistos com *C. albicans*. A presença de células de *S. gordonii* juntamente com *C. albicans*, induziu a formação de hifas mais extensas, mas não houve efeito significativo da di-hidroxipentadiona exógena (precursora do AI-2) sobre a formação de hifas (Bamford et al., 2009). Como muitas espécies bacterianas produzem diferentes derivados de AI-2 (De Keersmaecker et al., 2006), a função do AI-2 em interações entre *S. mutans* e *C. albicans* deve ser cuidadosamente investigada.

Em 2010, Joyner et al. demonstraram que *S. mutans* inibiu a formação de micélio por *C. albicans* quando essas espécies foram cultivadas conjuntamente por 16 h. Esses autores atribuíram os efeitos inibitórios na formação de hifa a um peptídeo natural produzido por *S. mutans*, o mutanobactin.

Gregoire, 2011 demonstrou que a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* na presença de sacarose pode ser mediada pela glicosiltransferase, enzima sintetizada por *S. mutans* para formação dos glucanos que possibilitam a aderência de *S. mutans* à superfície do esmalte dentário. Esses autores verificaram por microscopia de fluorescência que a

glicosiltransferase produzida por *S. mutans* foi capaz de se aderir à superfície celular de *C. albicans* e formar glucanos. Desse modo, o glucano presente na superfície da levedura aumentou a capacidade de aderência entre *S. mutans* e *C. albicans*.

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de *C. albicans* e *S. mutans* crescerem separadamente, mas apenas alguns relatos têm sido feitos quando ambas as espécies colonizam simultaneamente o mesmo nicho (Brusca et al., 2007; Pereira-Cenci et al., 2008; Jarosz et al., 2009). Embora o desenvolvimento da cárie esteja relacionado inicialmente com a formação do biofilme cariogênico por *S. mutans*, foi estabelecido que a progressão da lesão pode depender de outros micro-organismos, como *C. albicans* (Cuesta et al., 2010).

Brusca et al. (2013) avaliaram os mecanismos de interação microbiana entre *C. albicans* e *S. mutans* através da cinética de crescimento destes micro-organismos quando cultivados individualmente ou juntos por 36 h. Os resultados mostraram que as taxas de crescimento inicial de ambas as espécies foram positivamente influenciadas pela sua interação mútua, no entanto, em tempos de incubação mais longos, *C. albicans* impediu o crescimento bacteriano e atingiu concentrações 4 vezes superiores do que quando crescida individualmente. Os autores concluíram que a formação de biofilmes de *C. albicans* pode ser potencializada pela presença de *S. mutans* por dois mecanismos: sinergicamente quando incubados por curto período e pela concorrência em períodos de incubação mais longos.

Todos os estudos citados anteriormente foram realizados *in vitro*, despertando o interesse e necessidade de estudos *in vivo* para avaliar os efeitos modulatórios de *S. mutans* sobre os fatores de virulência e patogênese de *C. albicans*.

2.4 *Galleria mellonella*

Modelos *in vivo* para o estudo de infecções microbianas são escassos e restritos à ratos e camundongos. Mais recentemente, modelos de infecção em invertebrados foram desenvolvidos para facilitar o estudo da patogenese. Vários insetos tem sido utilizados para estudar a patogenicidade de fungos e bactérias (Cotter et al., 2000; Mansfield et al., 2003), assim como para avaliar a eficácia de uma variedade de antimicrobianos, sendo reconhecidos como modelos hospedeiros valiosos por reduzirem a necessidade de usar mamíferos para esses tipos de estudos (Chamillos et al., 2007).

Os insetos desenvolveram um sistema imunológico muito eficaz, onde seu funcionamento é baseado em mecanismos inatos humorais e celulares. Reações celulares, por exemplo, a fagocitose, são mediadas por hemócitos, considerando que as proteínas e peptídeos antimicrobianos são componentes importantes da resposta imune humoral. Peptídeos antimicrobianos são sintetizados no corpo de gordura (é funcionalmente equivalente ao fígado de mamíferos) durante a resposta sistêmica contra patógeno, e são então secretados na hemolinfa (Lavine, Strand, 2002; Leclerc, Reichhart, 2004; Bulet, Stocklin, 2005; Jiravanichpaisal et al., 2006; Ferrandon et al., 2007; Marmaras, Lampropoulou, 2009).

A traça maior da cera, *Galleria mellonella* (Lepidóptera), tem sido utilizada com sucesso durante vários anos como modelo de inseto para estudar a resposta imune. Pesquisas recentes revelaram a presença simultânea de diferentes peptídeos antimicrobianos na hemolinfa dessas lagartas quando infectadas por bactérias. Foram identificados até agora pelo menos dezoito peptídeos de defesa em *G. mellonella* com diferentes propriedades bioquímicas e antimicrobianas (Schuhmann et al., 2003; Kim et al., 2004; Lee et al., 2004; Cytrynska et al., 2007; Brown SE et al., 2008,

2009; Mak et al., 2010;). *G. mellonella* apresentam inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo, facilidade de manuseio, possibilidade de trabalho em grande escala e por não envolverem questões éticas (Cotter et al., 2000; Fuchs, Mylonakis, 2006; Pukkila-Worley et al., 2009; Rowan et al., 2009).

Também estão entre os modelos de invertebrados as amebas (*Acanthamoeba castellanii* e *Dictyostellium discoideum*) (Steenbergen et al., 2001, 2003), o nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Mylonakis et al., 2002) e os insetos *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori* (Brennan et al., 2002; Alarco et al., 2004; Fuchs et al., 2010; Lionakis, 2011).

Em relação a estes modelos experimentais de invertebrados, *G. mellonella* se destaca por poder ser mantida a uma temperatura entre 25 a 37°C, aproximando-se das condições de temperatura em que os fungos são encontrados na natureza ou no hospedeiro. Além disso, são facilmente inoculadas por *Candida*, permitindo uma inoculação precisa de células fúngicas na sua hemolinfa (Fuchs et al., 2010). A maior desvantagem desse modelo experimental é a ausência de métodos para análise genética e carência de informação sobre o seu genoma, que ainda não foi sequenciado (Mylonakis, Aballay 2005; Fuchs, Mylonakis, 2006; Chamillos et al., 2007; Mylonakis, 2008; Fuchs et al., 2010).

Lagartas de *G. mellonella* foram previamente utilizadas para estudar a infecção por vários patógenos, incluindo *Acinetobacter baumannii* (Peleg et al., 2009; Gaddy et al., 2012), *Francisella tularensis* (Aperis et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (Jander et al., 2000; Miyata et al., 2003), *Yersinia pseudotuberculosis* (Champion et al., 2009), *Staphylococcus aureus* (Desbois, Coote, 2011), *Streptococcus pyogenes* (Olsen et al., 2011), *Streptococcus mutans* (Abranches et al., 2011), *Enterococcus faecalis* (Yasmin et al., 2010; Michaux et al., 2011), *Candida*

albicans (Fuchs et al., 2010) e *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis et al., 2005).

As infecções por *C. albicans* tem sido muito estudadas no modelo de infecção experimental de *G. mellonella*. Brennan et al. (2002) demonstraram que genes importantes para a transição de levedura para hifa podem ser testados no modelo de *G. mellonella*, pois *C. albicans* causa uma infecção letal em *G. mellonella* (Cotter et al., 2000) e induz uma resposta imune (Bergin et al., 2003, 2006) que é útil para avaliar diferenças na patogenicidade entre as cepas de *Candida*. Fuchs et al. (2010) avaliaram *G. mellonella* como modelo hospedeiro para estudar a relação da filamentação de *C. albicans* com sua virulência. Foram avaliados cinco genes (BCR1, KEM1, SUV3, FLO8 e TEC1) que desempenham papéis na filamentação e os autores concluíram que *G. mellonella* foi um modelo útil para estudo da filamentação sobre a patogenicidade de *C. albicans*. Em 2011, Junqueira et al. realizaram estudo comparando isolados orais e sistêmicos em relação à formação de biofilme *in vitro* e patogenicidade destes isolados em *G. mellonella*. As espécies estudadas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitania* e *C. kefyr*. Os autores constataram que os isolados orais e sistêmicos apresentaram a mesma capacidade de formar biofilme e infectar *G. mellonella*. Além disso, os autores verificaram que a patogenicidade em *G. mellonella* foi dependente da espécie estudada.

Banville et al. (2012) avaliaram o efeito da privação nutricional sobre a capacidade da larva em resistir à infecção. Os autores observaram que as lagartas sem alimento durante sete dias demonstraram aumento da susceptibilidade à infecção por *C. albicans* e concluíram que a privação de alimentos para *G. mellonella* leva a uma redução nas respostas imunes e celulares, e conseqüentemente, aumento da susceptibilidade à infecção. Esses dados indicam a necessidade de uma padronização em relação à dieta de *G. mellonella* durante os experimentos.

Recentemente, inúmeros trabalhos utilizando *G. mellonella* como modelo de estudo para infecções bacterianas também tem sido realizados. Olsen et al. (2011) utilizaram *G. mellonella* para estudar a infecção por *Streptococcus pyogenes*. O inóculo foi injetado na hemolinfa da larva e a partir deste modelo de estudo foram realizados os seguintes testes: curva de sobrevivência, contagem de UFC/mL, avaliação da expressão gênica e análise histológica. Foram observados graves danos nos tecidos do hospedeiro e a intensidade da infecção e tempo de morte das lagartas foi dependente da concentração das células injetadas.

Abranches et al. (2011) demonstraram que cepas menos prevalentes dos sorotipos *e* e *f* de *S. mutans* são capazes de invadir a artéria coronária. Após analisar a aderência, poder de invasão em células endoteliais e virulência destas cepas em *G. mellonella*, foi observado através deste modelo de estudo que as cepas invasivas foram significativamente mais virulentas do que as cepas que não possuíam poder de invasão tecidual, diferença que pode ser explicada pela presença de um gene adicional nas cepas invasivas, o CNM, que se liga ao colágeno, facilitando a invasão tecidual. Assim, os autores puderam concluir que o gene CNM é necessário para que *S. mutans* invadam células endoteliais, representando um importante fator de virulência que parece estar associado à infecções cardiovasculares.

Em 2013, Chibebe Junior et al. utilizaram *G. mellonella* para o estudo *in vivo* da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) associada ou não ao uso de antimicrobianos convencionais para tratamento da infecção por diferentes cepas de *Enterococcus faecium*. Para o estudo da TFD isolada, as lagartas foram infectadas e 90 min após, foram injetados 10 µL do fotossensibilizador azul de metileno na hemolinfa destas lagartas e 30 min após, as lagartas foram irradiadas com laser. Os autores verificaram que após a utilização da TFDA, o tempo de sobrevivência de *G. mellonella* foi prolongado. Para o estudo da TFD associada a antibióticos, as lagartas foram previamente infectadas com *E. faecium* resistentes à

vancomicina e foi também observado aumento no tempo de sobrevivência das lagartas, sugerindo que as cepas de *E. faecium* que antes eram resistentes à vancomicina, após realizado o tratamento, tornaram-se suscetíveis a ação desta. Diante dos resultados, os autores concluíram que *G. mellonella* é um modelo invertebrado adequado para estudar a TFD isolada ou associada a antimicrobianos convencionais.

Apesar dos modelos de invertebrados apresentarem grande utilidade para o estudo da patogenicidade de micro-organismos e testes de possíveis novos agentes antimicrobianos (Okoli, 2009; Coleman et al., 2010; Mowlds et al., 2010), não existem trabalhos na literatura que estudaram a interação de *C. albicans* e *S. mutans* em modelo de *G. mellonella*.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi avaliar as interações microbianas entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em modelos de biofilmes formados *in vitro* e no modelo experimental de *Galleria mellonella*.

Os objetivos específicos desse estudo foram:

- Avaliar os efeitos *in vitro* de *S. mutans* sobre a formação de biofilme de *C. albicans*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias e análise por microscopia eletrônica de varredura, e sobre a morfogênese de *C. albicans*;
- Analisar os efeitos *in vivo* de *S. mutans* sobre a candidose experimental no modelo invertebrado *G. mellonella* por meio da análise de curva de sobrevivência de *G. mellonella*, por estudos de cultura da hemolinfa para quantificação de UFC/mL de *C. albicans* e pela avaliação histológica da filamentação de *C. albicans* nos tecidos do hospedeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de micro-organismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Streptococcus mutans* (UA 159) mantidas em freezer a menos 80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia - Campus de São José dos Campos/SP. Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *C. albicans* foi cultivada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM por 24 h a 37°C e a cepa de *S. mutans* foi cultivada em caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) acrescido de 5% de sacarose por 48 h a 37°C em microaerofilia (5% de CO₂).

4.2 Interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em modelos *in vitro*

4.2.1 Grupos experimentais

No estudo *in vitro* da interação de *C. albicans* e *S. mutans*, foram avaliados os efeitos de *S. mutans* sobre a formação de biofilme (Quadro 1) e sobre a capacidade de filamentação de *C. albicans* (Quadro 2). Para ambos os testes, foram avaliados os efeitos diretos das células de

S. mutans e também seus efeitos indiretos sobre *C. albicans*, utilizando apenas o sobrenadante da cultura do estreptococos.

O primeiro teste realizado foi a análise dos efeitos diretos das células de *S. mutans* e seus efeitos indiretos utilizando apenas seu sobrenadante sobre o biofilme de *C. albicans*, no qual foram testados os efeitos de *S. mutans* sobre *C. albicans* em diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana (4, 6, 18 e 24 h). De acordo com os resultados obtidos, o tempo da cultura de estreptococos que mais influenciou *C. albicans*, foi adotado para os testes subsequentes.

Quadro 1 – Método de análise, tempo de cultura e número de ensaios realizados para cada grupo experimental

Testes	Análise	Tempo da cultura de <i>S. mutans</i>	n
10 ⁷ células/mL de <i>S. mutans</i> sobre biofilme de <i>C. albicans</i> (Grupo Interação Célula)	UFC/mL	4 h	10
		6 h	10
		18 h	10
		24 h	10
	MEV	4 h	3
Sobrenadante da cultura de 10 ⁷ células/mL de <i>S. mutans</i> sobre biofilme de <i>C. albicans</i> (Grupo Interação Sobrenadante)	UFC/mL	4 h	10
		6 h	10
		18 h	10
		24 h	10
	MEV	4 h	3
PBS sobre biofilme de <i>C. albicans</i> (Grupo Controle)	UFC/mL	-	10
	MEV		3
Total de experimentos			99

Quadro 2 - Número de ensaios realizados em cada grupo experimental para o estudo dos efeitos de *S. mutans* sobre a filamentação de *C. albicans*

Testes	Análise	Tempo da cultura de <i>S. mutans</i>	n
10 ⁷ células/mL de <i>S. mutans</i> sobre <i>C. albicans</i>	Quantificação das hifas	4 h	5
Sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre <i>C. albicans</i>	Quantificação das hifas	4 h	5
PBS sobre <i>C. albicans</i> (Grupo Controle)	Quantificação das hifas	-	5
Total de experimentos			15

4.2.2 Estudo dos efeitos de *S. mutans* sobre biofilmes de *C. albicans*

4.2.2.1 Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans* e *S. mutans*

C. albicans foi cultivada a 37°C por 24 h em caldo YNB (Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. e *S. mutans* foi cultivado em caldo BHI (Himedia, Mumbai, Índia) a 37°C, incubado em microaerofilia (5% de CO₂) por 4 h.

Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas (1300 *xg* por 10 min), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 10⁷ micro-organismos/mL. Os valores do comprimento de onda foram 0,530 nm para *C. albicans* e 0,398 nm para *S. mutans*, enquanto que a densidade óptica foi de 0,381 e 0,560 para *C. albicans* e *S. mutans* respectivamente.

4.2.2.2 Preparo do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Para o preparo do sobrenadante de *S. mutans*, a cepa foi incubada em caldo BHI a 37°C por 24h em microaerofilia. Após este período, foi realizada a suspensão padronizada de 10^7 células/mL conforme descrito anteriormente. Foi transferido o volume de 1 mL da suspensão padronizada para tubo Falcon contendo 6 mL de caldo BHI suplementado com 5% de sacarose e incubados novamente a 37°C por 4 h em microaerofilia. Após este período, o caldo foi centrifugado (1300 $\times g$ por 10 min) e filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 μm (MFS, Dublin, EUA).

4.2.2.3 Formação dos biofilmes

Para formação dos biofilmes foi utilizada a metodologia descrita por Thein et al. (2006) com modificações.

Os biofilmes foram formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Para isso, inicialmente foram inoculados 100 μL da suspensão padronizada de *C. albicans* (10^7 células/mL). A placa foi incubada em agitação com rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37°C por 90 min, para promover a adesão inicial dos micro-organismos.

Após esta fase inicial de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado 2x com PBS para remoção das células fracamente aderidas. O volume de 100 μL de soro fetal bovino foi transferido para cada poço e a placa re-incubada por 2 h. Após este período, os poços foram lavados 2x com 100 μL de PBS.

Em cada poço da placa, foi inoculado 50 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* ou 50 µL do sobrenadante da cultura de *S. mutans*. No grupo controle, foi inoculado 50 µL de PBS.

Para o crescimento do biofilme, 140 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e 60 µL de caldo BHI acrescido de sacarose foram acrescentados a cada poço. Os caldos foram trocados a cada 24 h e as placas foram tampadas e incubadas a 37°C em estufa com agitação de 75 rpm por 48 h.

4.2.2.4 Determinação do número de UFC/mL

Após 48 h de incubação, cada poço contendo biofilme foi lavado 2x com PBS. Em seguida, 250 µL de PBS foram transferidos para cada poço e o biofilme aderido ao fundo da placa foi rompido por homogeneização por 30 s em homogeneizador ultrassônico (Sonics Vibra Cell) com amplificação de 25%. O volume de 100 µL deste inóculo foi transferido para tubos Eppendorf contendo 900 µL de PBS.

A partir da solução obtida nos tubos Eppendorf, foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura seletivos: ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans* e ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) acrescido de bacitracina (0,2 UI por mL de meio) e de 5% de sacarose (MSBS) para *S. mutans*. Para o crescimento de *C. albicans*, as placas foram incubadas em estufa comum por 48 h enquanto que, para o crescimento de *S. mutans*, as placas foram incubadas por 48 h em microaerofilia. Após este período, foi realizado o cálculo de UFC/mL.

4.2.2.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizado como corpos-de-prova peças de acrílico com 8 mm de diâmetro colocadas em placa de 24 poços para aderência do biofilme. Os biofilmes foram formados conforme descrito no item 4.2.2.3. A seguir, as peças foram transferidas para placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 h. Após este período, as peças foram submersas em 1 mL de solução de álcool nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 90% por 20 min para cada concentração e, posteriormente, em 100% de álcool por 1 h. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 h para secagem completa das peças.

As peças foram retiradas do fundo da placa com o auxílio de uma pinça estéril, transferidas para *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 160 s a 40 mA (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, as peças foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV - Jeol JSM5600) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), operando em 15kV nos aumentos de 1.000, 5.000 e 10.000 vezes.

4.2.3 Estudo dos efeitos de *S. mutans* sobre filamentação de *C. albicans*

Para o estudo da filamentação *in vitro*, foram realizados ensaios com os seguintes grupos experimentais: Controle PBS (*C. albicans* e PBS), Controle BHI (*C. albicans* e caldo BHI), Interação Célula (*C. albicans* e células de *S. mutans*) e Interação Sobrenadante (*C. albicans* e sobrenadante de *S. mutans*).

Após o crescimento de 24 h de *C. albicans* e *S. mutans* em

caldos YNB e BHI, respectivamente, o crescimento em caldo das cepas foram centrifugados para o preparo de suspensões padronizadas de 10^7 células/mL conforme descrito no item 4.2.2.1. Foi preparado também o sobrenadante da cultura de *S. mutans* de acordo com o item 4.2.2.2.

Em placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foi colocado 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans*.

A seguir, em cada poço foi adicionado 50 μ L da suspensão padronizada de *S. mutans* ou 50 μ L do sobrenadante da cultura de *S. mutans*. Nos grupos controle, foram adicionados em cada poço 50 μ L de PBS ou 50 μ L de caldo BHI, dependendo do grupo experimental.

A placa contendo os inóculos foi incubada a 37°C em microaerofilia. Após 24 h de incubação, 50 μ L do inóculo contido em cada poço foi espalhado sobre lâminas de vidro com 10 campos previamente demarcados no verso da lâmina.

O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e as lâminas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 400x. Foram realizados 5 ensaios para cada grupo experimental. Os ensaios foram repetidos 2x vezes em momentos distintos. As imagens foram analisadas quanto à morfologia de *C. albicans* e para quantificação das hifas presentes, foram analisados 10 campos microscópios em cada lâmina, sendo que foi padronizado o ponto médio de cada campo para a análise. Em cada campo microscópio foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presentes (Quadro 3).

Quadro 3 – Escores utilizados para a contagem de número de hifas presentes em cada campo observado através da microscopia óptica

Escores	Quantidade de hifas
0	Ausente
1	1 a 3
2	4 a 10
3	11 a 20
4	Mais de 20

4.3 Interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em modelo experimental de *Galleria mellonella*

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis et al. (2005) e Fuchs et al. (2010).

4.3.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais e número de lagartas utilizadas para cada experimento estão discriminadas no Quadro 4.

Quadro 4 – Testes, grupos experimentais e número de lagartas utilizadas por experimento

Grupos Experimentais	Curva de sobrevivência	Contagem de UFC/mL				Análise histológica
		0h	4h	8h	12h	
Infecção por <i>S. mutans</i>	64	-	-	-	-	-
Controle PBS	16	9	9	9	9	3
Controle BHI	16	-	-	-	-	3
Interação Célula	16	9	9	9	9	3
Interação Sobrenadante	16	9	9	9	9	3
PBS apenas	16	-	-	-	-	3
Sem injeção	16	-	-	-	-	-
TOTAL	160	108				15

4.3.2 *Galleria mellonella*

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 25 mg cedidas pela pesquisadora Márcia Prata da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As lagartas foram mantidas sem alimento durante todo experimento.

4.3.3 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *S. mutans*

Antes do estudo da interação entre *C. albicans* e *S. mutans*, foi realizada análise da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção por *S. mutans* para determinação da concentração sub-letal para este micro-organismo nesses animais.

Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* suspensões padronizadas de *S. mutans* em diferentes concentrações (10^4 a 10^7 células/mL). Estas suspensões foram preparadas de acordo com o item 4.2.2.1 e padronizadas em espectrofotômetro. Para cada concentração, foi utilizado um grupo de 16 lagartas, onde um inóculo de 5 μ L de cada suspensão foi injetado em *G. mellonella* para determinação da curva de sobrevivência, conforme será descrito a seguir no item 4.3.4.3.

4.3.4 Efeitos de *S. mutans* na candidose experimental em *G. mellonella*

4.3.4.1 Preparo das suspensões padronizadas de *C. albicans* e *S. mutans*

C. albicans foi cultivada a 37°C por 18 h em caldo YNB (Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. A seguir, as células foram centrifugadas a 1300 Xg por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuspensionado em 3 mL de PBS e misturado em agitador de tubos (Vortex) por 30 s. Esta lavagem das células foi repetida e a densidade celular de *C. albicans* foi ajustada em 10^5 células/mL por meio de hemocítômetro.

A suspensão padronizada de *S. mutans* foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.1, utilizando nesta etapa a concentração sub-letal de 10^5 células/mL definida anteriormente. O sobrenadante de *S. mutans* também foi preparado como já descrito no item 4.2.2.2.

4.3.4.2 Injeção dos micro-organismos em *G. mellonella*

Um inóculo de 5 μ L da suspensão padronizada de *Candida* foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última *proleg* esquerda, utilizando seringa Hamilton de 10 μ L. Foi inoculado também 5 μ L da suspensão de *S. mutans* ou 5 μ L do seu sobrenadante na *proleg* direita. Para os grupos com infecção por um único micro-organismo, foi inoculado 5 μ L da suspensão do micro-organismo (*C. albicans* ou *S. mutans*) na *proleg* esquerda e o mesmo volume de PBS na *proleg* direita.

Também foram avaliados um grupo inoculado apenas com PBS para comprovar que a morte não ocorreu pelo trauma da agulha e outro grupo sem injeção para acompanhar o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

Antes da inoculação, as seringas (Hamilton Inc., EUA), utilizadas para as injeções foram esterilizadas com ácido peracético (Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foram realizadas a cada 5 injeções. Para esta limpeza a seringa foi lavada em uma sequência de 4 tubos Falcon que continham respectivamente: 1º) 20 mL de hipoclorito de sódio, 2º) 20 mL de álcool absoluto, 3º) 20 mL de água destilada estéril e 4º) 20 mL de PBS estéril. Em cada tubo a agulha foi mergulhada e realizados 5 movimentos no êmbolo para cima e para baixo, na sequência descrita acima.

4.3.4.3 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Após as inoculações, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado primeiramente 18 h após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente a cada 24 h, sendo monitoradas por 7 dias após o início do experimento. As lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A morte de todas as lagartas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento.

4.3.4.4 Estudo da cultura da hemolinfa - Contagem de UFC/mL

Para quantificar a presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella*, foram feitas retiradas temporais (0, 4, 8 e 12 h) da hemolinfa das lagartas (Figura 1) dos seguintes grupos experimentais: Controle PBS, Interação Célula e Interação Sobrenadante.

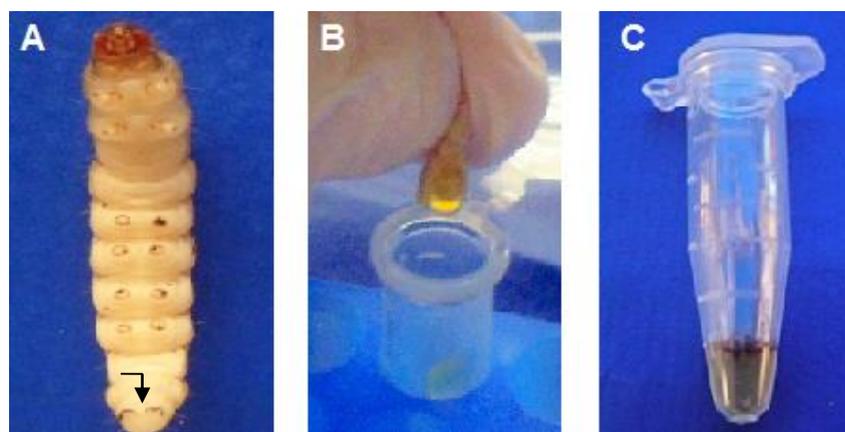


Figura 1 - Imagem da retirada de hemolinfa de *G. mellonella*. A) Seta representa a sequência de incisões para retirada da hemolinfa; B) Hemolinfa sendo retirada após a incisão; C) Tubo Eppendorf com a quantidade de hemolinfa referente ao *pool* de 3 lagartas.

Para cada tempo e grupo experimental, foi utilizado um *pool* de 3 lagartas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. As lagartas foram cortadas com bisturi na parte ventral e espremidas para a retirada da hemolinfa.

Dez microlitros da hemolinfa coletada foram homogeneizados em 990 μ L de PBS. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas e sementeiras em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para crescimento de *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e posteriormente foi feita a contagem para cálculo de UFC/mL.

Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada tempo de cada grupo foram utilizadas 9 lagartas, totalizando 108 lagartas.

4.3.4.5 Análise histológica de *G. mellonella*

A análise histológica foi realizada para verificar os efeitos de *S. mutans* sobre filamentação de *C. albicans* em *G. mellonella*. Foram avaliados os seguintes grupos experimentais: Controle PBS, Controle BHI, Interação Célula e Interação Sobrenadante. Para cada grupo experimental foram utilizadas 3 lagartas.

Após 18 h da inoculação, foi realizada uma incisão na linha mediana da parte ventral do animal. A partir desta incisão a hemolinfa foi descartada e o corpo de gordura removido (Figura 2).

O corpo de gordura foi colocado em formalina a 10% e armazenado a 4°C para fixação por 24 h. Após este período, o tecido foi colocado em álcool a 50, 70 e 90% por 1 h para cada uma das concentrações e 100% durante 3 h para promover a desidratação. O tecido foi transferido para uma solução de xilol durante 3 h e montados em blocos de parafina.

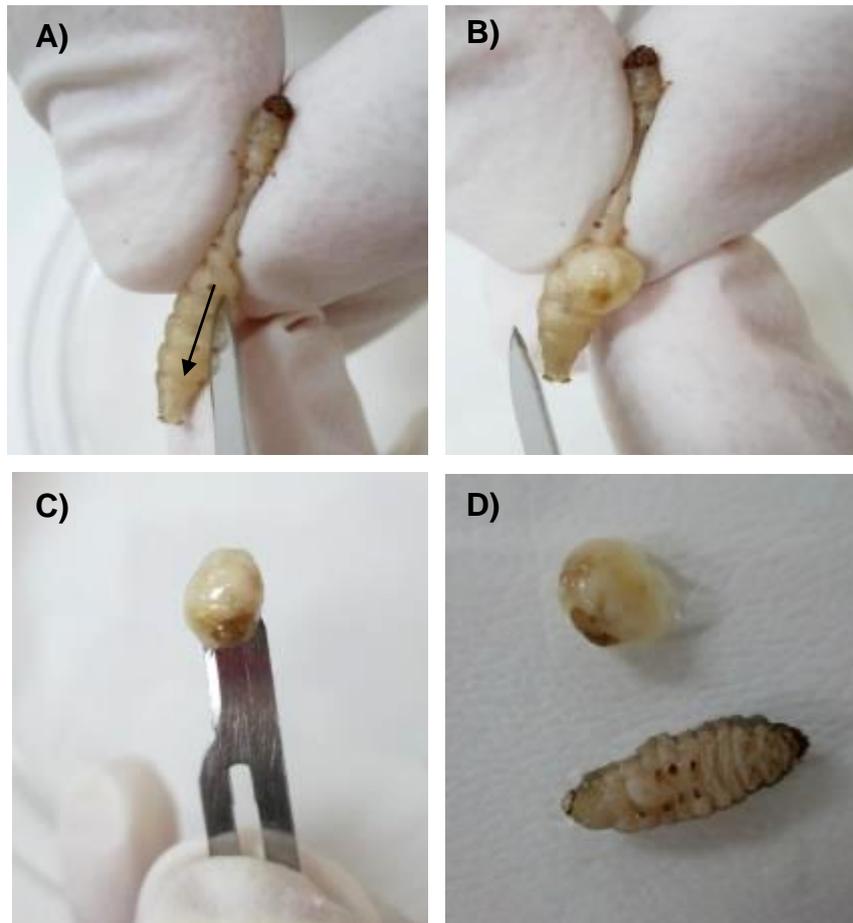


Figura 2 – Sequência da retirada do corpo de gordura de *G. mellonella*. A) Corte longitudinal realizado na parte ventral da lagarta (seta); B) Pressão lateral realizada na lagarta para remoção do corpo de gordura; C) Visualização do corpo de gordura; D) comparação do corpo de gordura com o tamanho da lagarta.

A partir dos blocos de parafina, foram realizados cortes seriados de 5 μm de espessura, que foram montados em lâmina de vidro e corados com Ácido Periódico de Shiff (PAS). Após a secagem completa das lâminas, os tecidos de *G. mellonella* e a presença de leveduras e hifas foram observados em microscópio óptico nos aumentos de 100, 630 e 1000x. Para análise da filamentação, foram fotografadas todas as áreas do corte histológico coradas pelo PAS, indicando presença de leveduras e hifas em um aumento original de 100x, através da câmara digital Cyber Shott modelo DSC-585 (Sony Corporation) acoplada ao microscópio de luz

Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Em cada imagem foi determinada a área ocupada (μm) por leveduras e hifas (Figura 3), com auxílio do programa Image-J (Versão 1,32 para *Windows*), de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA. Todas as áreas delimitadas de cada corte foram somadas e o resultado foi convertido para Log_{10} .

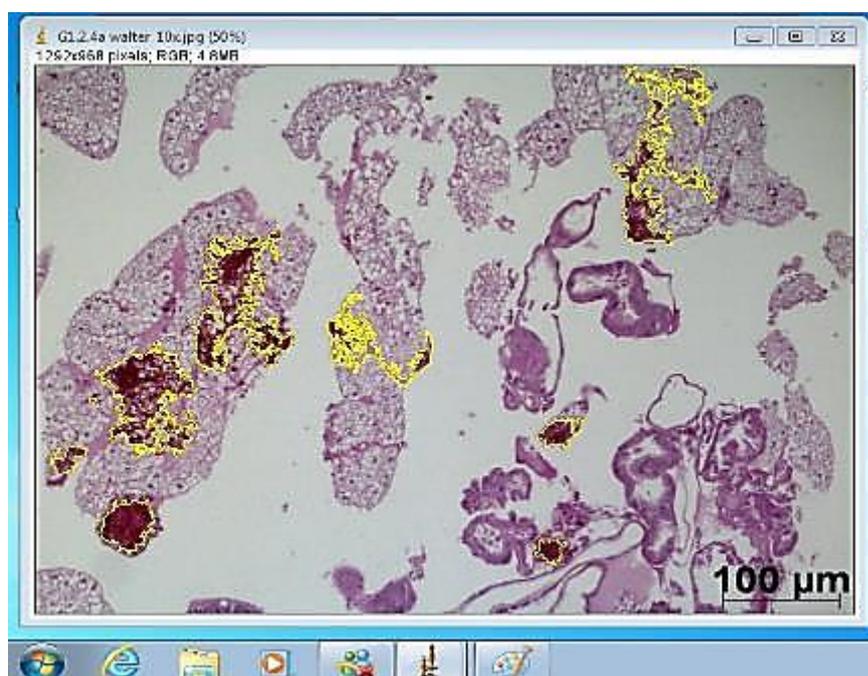


Figura 3 – Delimitação das áreas ocupadas por leveduras e hifas de *C. albicans* presentes no corpo de gordura de *G. mellonella*, com auxílio do programa Image J.

4.4 Análise estatística

Para análise estatística dos dados de UFC/mL dos testes de formação de biofilme *in vitro*, quantificação de *C. albicans* em *G. mellonella* e avaliação da presença de leveduras e hifas de *C. albicans* no corpo de gordura de *G. mellonella* (análise histológica) foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey. Para os escores obtidos

na análise de filamentação *in vitro*, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Todos esses testes estatísticos foram realizados no programa Minitab.

Para avaliação da sobrevivência de *G. mellonella*, foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel-Cox) utilizando o Programa Graph Pad Prism. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em modelos *in vitro*

5.1.1 Efeitos de *S. mutans* sobre biofilmes de *C. albicans* - UFC/mL

Primeiramente, foram testados os efeitos diretos de *S. mutans* sobre *C. albicans* em diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana (4, 6, 18 e 24 h). De acordo com os resultados obtidos, houve aumento significativo ($P = 0,0001$) do número de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* quando em contato com células de *S. mutans* em todos tempos testados (Tabela 1), com aumento de 1,28, 1,38, 1,52 e 1,43 Log_{10} na contagem de *Candida* nos tempos de cultura de *S. mutans* de 4, 6, 18 e 24 h respectivamente.

Tabela 1- Média e desvio padrão do número de UFC/mL (log_{10}) de *C. albicans* nos biofilmes dos grupos Controle PBS e Interação Célula, nas diferentes fases de crescimento da cultura de *S. mutans*

Tempo da cultura de <i>S. mutans</i>	Controle PBS (n=10)	Interação Célula (n=10)
4h		7,54 ± 0,06
6h		7,64 ± 0,04
18h	6,27 ± 0,07	7,78 ± 0,06
24h		7,70 ± 0,06

Também foram testados os efeitos indiretos de *S. mutans* sobre biofilme de *C. albicans* em diferentes fases de crescimento da cultura

bacteriana (4, 6, 18 e 24 h), onde verificou-se efeito inibitório significativo ($P = 0,0001$) do sobrenadante de *S. mutans* sobre o biofilme de *C. albicans* em todos os tempos testados (Tabela 2), reduzindo 0,80, 0,78, 0,50 e 0,72 Log_{10} na contagem de *C. albicans* para os tempos de cultura de *S. mutans* de 4, 6, 18 e 24 h respectivamente.

Tabela 2- Média e desvio padrão do número de UFC/mL (log_{10}) obtidos a partir da contagem de *C. albicans* nos biofilmes dos grupos Controle e Interação com sobrenadante de *S. mutans* nas diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana

Tempo da cultura de <i>S. mutans</i>	Controle PBS (n=10)	Interação Sobrenadante (n=10)
4 h		$7,19 \pm 0,03$
6 h		$7,17 \pm 0,47$
18 h	$7,98 \pm 0,26$	$7,49 \pm 0,07$
24 h		$7,27 \pm 0,12$

A partir destes resultados, o tempo de 4 h de cultura de *S. mutans* foi adotado para todos testes subsequentes, já que neste determinado tempo, houve maior inibição (0,80 Log_{10}) na formação de biofilme de *C. albicans* quando em contato com o sobrenadante de *S. mutans* e menor aumento (1,28 Log_{10}) na formação de biofilme quando *C. albicans* esteve em contato direto com as células de *S. mutans*, comparado aos outros tempos da cultura bacteriana.

Com o tempo de cultura de 4 h estabelecido, a análise da interação entre *S. mutans* e *C. albicans* em modelo de formação de biofilme *in vitro* foi repetido afim de avaliar todos os grupos experimentais no mesmo teste. A contagem de UFC/mL de *C. albicans* aumentou significativamente ($P = 0,03$) quando em contato com células de *S. mutans* ($8,23 \pm 0,12$), entretanto, quando *C. albicans* foi associada apenas com o sobrenadante

da cultura de *S. mutans* ($7,89 \pm 0,16$), houve redução significativa ($P = 0,001$) na contagem de *Candida* em relação ao grupo controle (Figura 4).

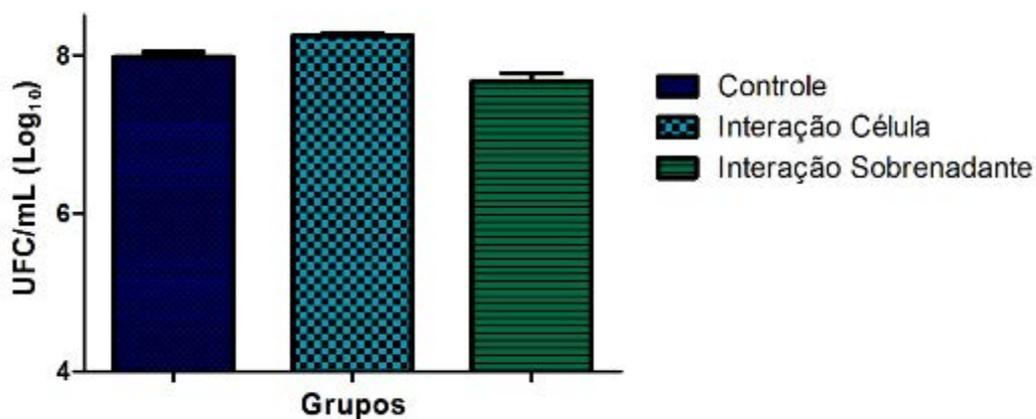


Figura 4 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos na formação de biofilme *in vitro* por *C. albicans* quando em contato com as células ou apenas o sobrenadante da cultura de *S. mutans*.

5.1.2 Efeitos de *S. mutans* sobre filamentação de *C. albicans*

Para estudo dos efeitos de *S. mutans* sobre filamentação de *C. albicans*, os grupos experimentais foram incubados por 24 h em microaerofilia (5% de CO₂) e após este período, a formação de hifas foi visualizada (Figura 5) e quantificada em microscopia óptica com aumento de 400x.

Para verificar se a composição do caldo BHI sem a presença dos produtos de *S. mutans* teve algum efeito sobre o aspecto morfológico de *C. albicans*, foi acrescentado neste teste o grupo Controle BHI, onde *C. albicans* foi colocada apenas em contato com este caldo. Os resultados deste grupo foram semelhantes ao grupo Controle PBS.

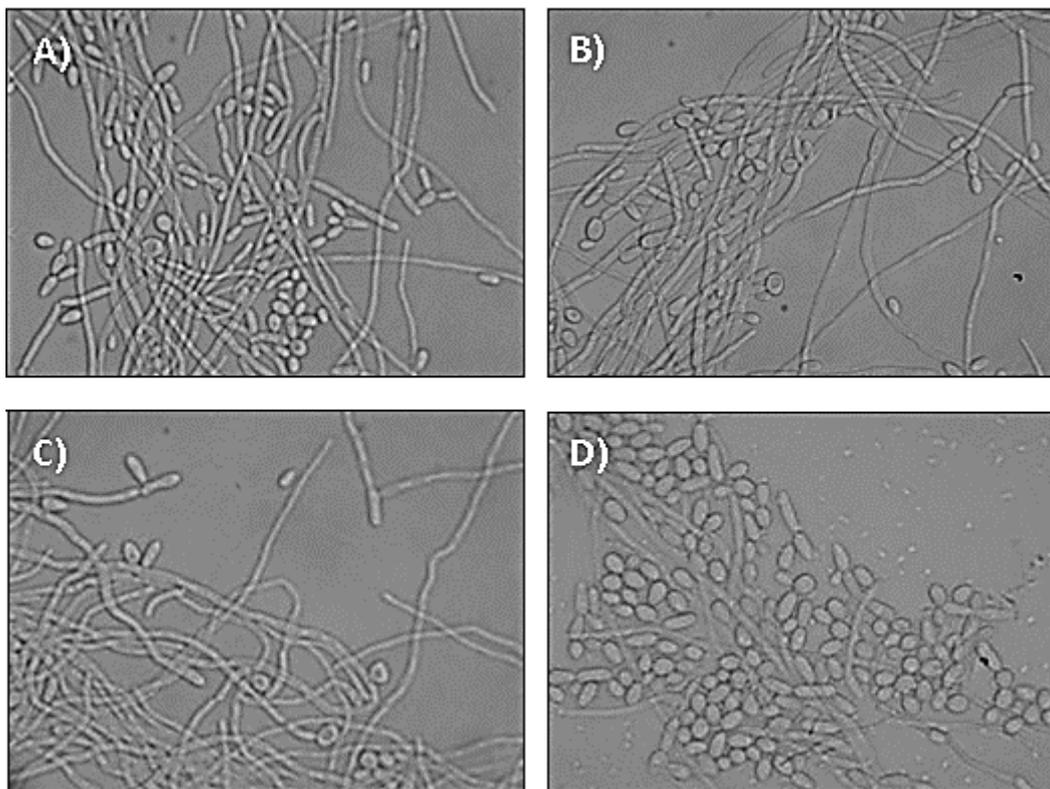


Figura 5 – Imagens de microscopia óptica ilustrando morfologia de *C. albicans* quando em contato com: A) PBS apenas (Controle PBS); B) Células de *S. mutans* (Interação Célula); C) Caldo BHI (Controle BHI); D) Sobrenadante da cultura de *S. mutans* (Interação Sobrenadante). Nota-se através da imagem D predomínio de leveduras em relação aos demais grupos, que apresentaram predomínio de hifas (imagens A, B e C), demonstrando que o sobrenadante de *S. mutans* atuou na transição morfológica de *C. albicans* inibindo a formação de hifas.

Após análise morfológica das lâminas, foi quantificado através de escores a presença de hifas nas lâminas observadas. A partir dos resultados obtidos (Tabela 3) foi verificado inibição da transição morfológica de *C. albicans* na presença do sobrenadante de *S. mutans*, com redução significativa ($P = 0,0003$) em relação aos grupos controles (Controle PBS e Controle BHI), enquanto que a presença de células de *S. mutans* não alterou a formação de hifas por *C. albicans* (Figura 6).

Tabela 3 - Média, Desvio-Padrão (DP) e mediana obtidos a partir dos escores da presença de hifas de *C. albicans* após 24 h da indução da filamentação *in vitro* para os grupos: Controle PBS, Controle BHI, Interação Célula (*C. albicans* e células de *S. mutans*) e Interação Sobrenadante (*C. albicans* e sobrenadante de *S. mutans*)

Grupos	Média e DP	Mediana
Controle PBS	4,00 ± 0,00	4,00
Controle BHI	4,00 ± 0,00	4,00
Interação Célula	4,00 ± 0,00	4,00
Interação Sobrenadante	2,70 ± 0,76	3,00

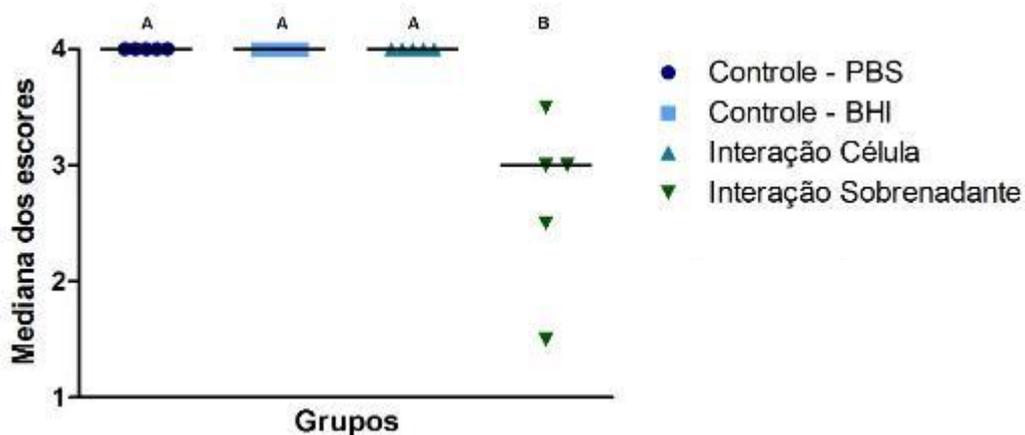


Figura 6 – Gráfico representando a mediana dos escores obtidos com a formação de hifas de *C. albicans* observadas em microscopia óptica nos diversos grupos experimentais. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($P = 0,0003$).

5.1.3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

A formação de biofilmes monotípicos de *C. albicans* e heterotípicos de *C. albicans* e *S. mutans* sobre corpos de prova de acrílico foi comprovada pela MEV, onde foi possível identificar estruturas presentes no biofilme maduro, como presença de matriz polimérica extracelular e canais de água responsáveis pela nutrição do biofilme (Figura 7).

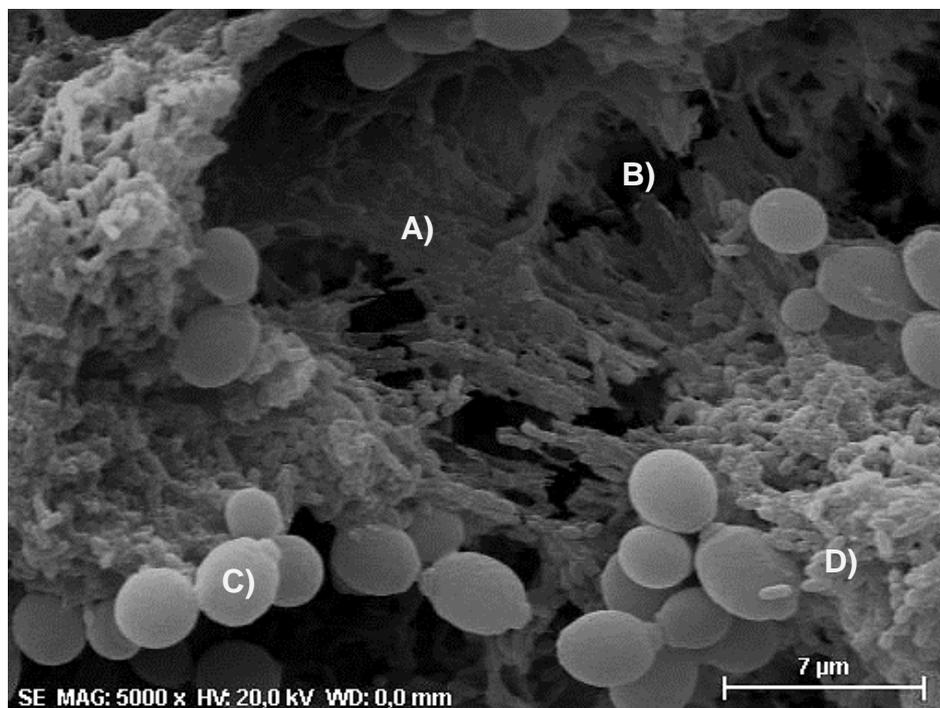


Figura 7 – MEV do biofilme heterotípico de *C. albicans* e *S. mutans*, sugerindo a presença das seguintes estruturas: A) Matriz extracelular polimérica; B) Canal de água; C) Levedura de *C. albicans*; D) Células de *S. mutans*. Aumento original: 5000x.

Os grupos experimentais foram avaliados quanto à morfologia de *C. albicans*, onde foi observado que o grupo Controle PBS apresentou predomínio de hifas e poucas leveduras (Figura 8).

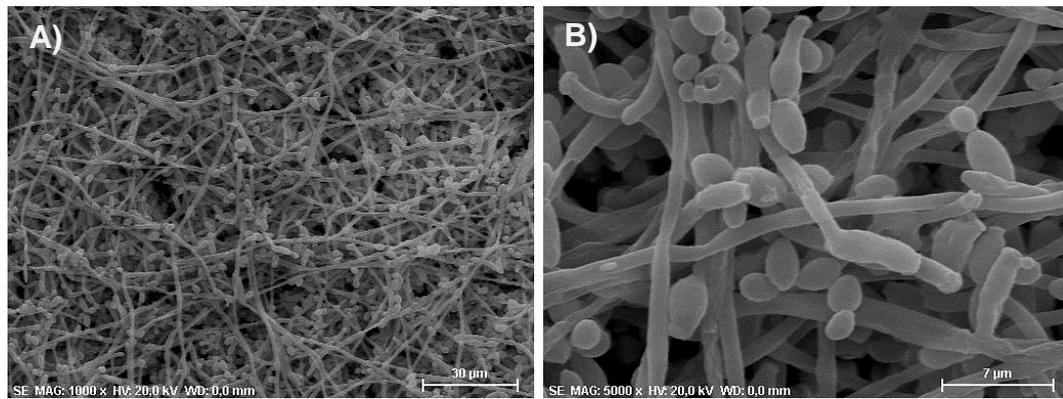


Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo Controle PBS (biofilme monotípico de *C. albicans*) mostrando extensa rede de hifas e poucas leveduras de *C. albicans*. Aumentos originais: A) 1000x e B) 5000x.

No grupo Interação Célula, foi observado redução de hifas e aumento de leveduras de *C. albicans* (Figura 9) em relação ao grupo Controle PBS, formado pelo biofilme monotípico de *C. albicans*.

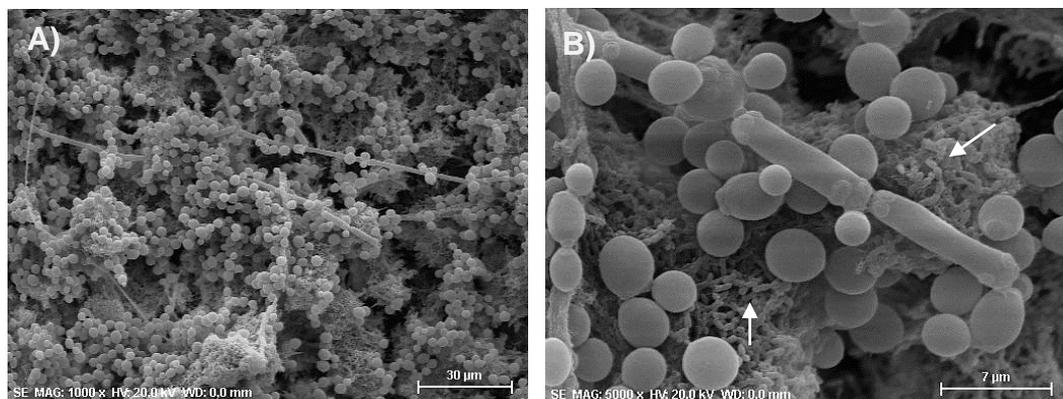


Figura 9 - MEV do grupo Interação Célula. Nota-se redução de hifas e prevalência de leveduras de *C. albicans* em relação ao grupo Controle PBS. Na figura B), as setas mostram a presença de células de *S. mutans* no biofilme heterotípico. Aumentos originais: A) 1000x e B) 5000x.

Através das imagens obtidas com a formação do biofilme do grupo Interação Sobrenadante, verificou-se o predomínio de leveduras e ausência de hifas, sugerindo que o sobrenadante de *S. mutans* inibiu a formação de hifas por *C. albicans* (Figura 10).

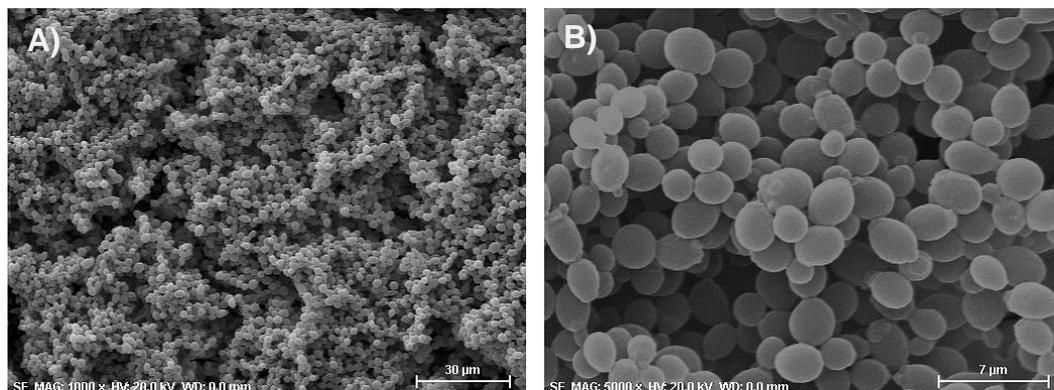


Figura 10 – Imagens de MEV do grupo Interação Sobrenadante, demonstrando que o sobrenadante de *S. mutans* inibiu a formação de hifas por *C. albicans*, predominando a forma de leveduras. Aumentos originais: A) 1000x e B) 5000x.

Os resultados apresentados sugerem que *S. mutans* secretam subprodutos no meio de cultura *in vitro* que apresentam efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, interferindo na sua capacidade de filamentação e formação de biofilme.

5.2 Interação entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em modelo experimental de *Galleria mellonella*

5.2.1 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *S. mutans*

Primeiramente, foi avaliada a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por diversas concentrações de *S. mutans* (10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 células /mL) para determinação da concentração sub-letal para este micro-organismo nesses animais.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que a patogenicidade *S. mutans* em *G. mellonella* foi dose-dependente, sendo que nas concentrações de 10^6 e 10^7 células/mL, houve respectivamente 68 e 87% de taxa de morte em 48 h, enquanto que as concentrações de 10^4 e

10^5 células /mL de *S. mutans* não causaram infecção nos animais.

A partir destes dados, a concentração sub-letal de *S. mutans* adotada para todos os ensaios subseqüentes foi de 10^5 células/mL, uma vez que esta é a mesma concentração utilizada para a infecção de *C. albicans* em *G. mellonella*.

5.2.2 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Para este teste, foram avaliados os efeitos de *S. mutans* sobre *C. albicans* considerando os seguintes grupos experimentais: Controle PBS, Controle BHI, Interação Célula (*C. albicans* e células de *S. mutans*) e Interação Sobrenadante (*C. albicans* e sobrenadante de *S. mutans*).

Em todos os grupos foram realizadas duas injeções, uma na última *proleg* esquerda e outra na última *proleg* direita da lagarta. Cada injeção continha 5 μ L da substância a ser testada de acordo com os grupos experimentais.

A patogenicidade de *C. albicans* em *G. mellonella* foi dependente do grupo estudado. Os grupos Controles com inoculação de *C. albicans* e PBS ou *C. albicans* e BHI foram os mais virulentos com morte de 100% das lagartas em até 24 h.

Quando a injeção de *C. albicans* em *G. mellonella* foi seguida por injeção de células ou sobrenadante de *S. mutans*, a sobrevivência das lagartas aumentou, permanecendo algumas lagartas vivas até o término do experimento (168 h após as inoculações), como demonstrado abaixo (Figura 11), sugerindo que *S. mutans* combateu a infecção causada por *C. albicans* neste hospedeiro.

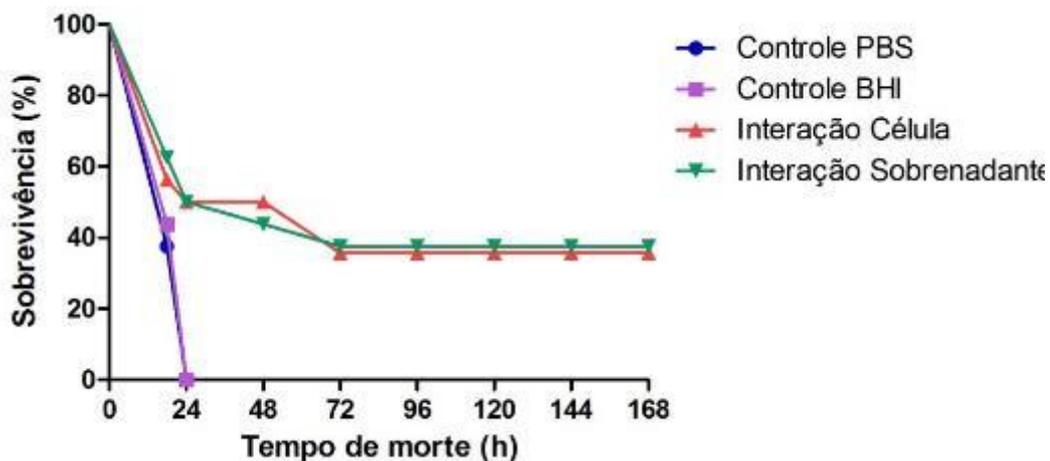


Figura 11 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* para diferentes grupos experimentais. Nos grupos Controle PBS e Controle BHI houve morte de 100% das lagartas em até 24 h, enquanto que a presença das células e sobrenadante de *S. mutans* prolongou a vida das lagartas.

Para análise estatística, primeiramente comparamos o comportamento entre os grupos Controle PBS e Controle BHI, verificando que não houve diferença estatística ($P = 0,72$) entre estes grupos, mostrando que o caldo BHI não interferiu nos fatores de virulência de *C. albicans*.

A seguir, os grupos Interação Célula e Interação Sobrenadante foram comparados ao grupo Controle PBS, verificando que a sobrevivência das lagartas foi maior para estes grupos, com diferenças estatisticamente significantes para a associação de *C. albicans* com células ($P = 0,0068$) e sobrenadante de *S. mutans* ($P = 0,0043$).

5.2.3 Estudo da cultura de hemolinfa de *G. mellonella*

Neste teste foi quantificado UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa de *G. mellonella* após diferentes tempos de infecção (0, 4, 8 e 12

h) dos seguintes grupos experimentais: Controle PBS, Interação Célula e Interação Sobrenadante. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada grupo e tempo analisado.

A partir dos resultados, verificou-se haver um padrão de crescimento de *C. albicans* semelhante para todos os grupos experimentais em relação aos tempos estudados, nos quais verificou-se que logo após a infecção por *C. albicans* (tempo 0), o número de UFC/mL na hemolinfa foi aproximadamente 6 log, reduzindo para 4 a 5 log nos tempos de 4 e 8 h, e voltando a atingir 6 log no tempo de 12 h (Figura 12). A redução em log observada no tempo de 4 h foi mais significativa ($P = 0,0003$) para os grupos Controle PBS e Interação Sobrenadante do que para o grupo Interação Célula (Tabela 4).

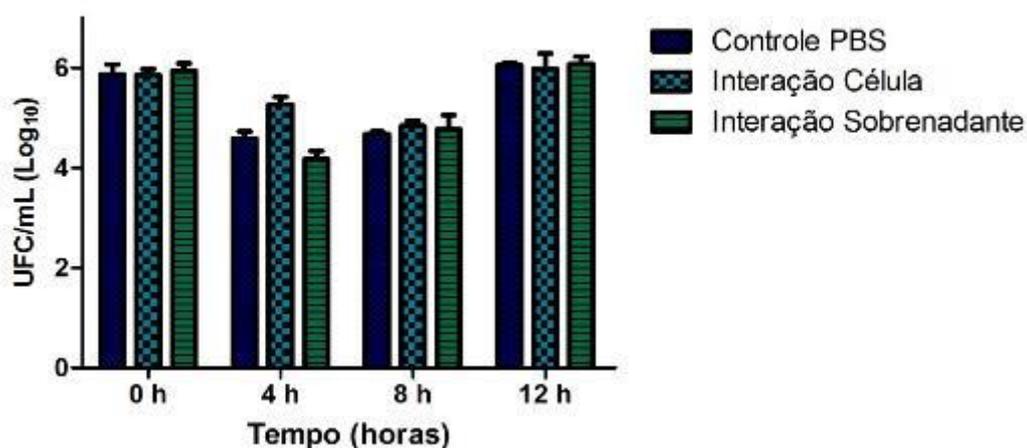


Figura 12 – UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8 e 12 h. Nota-se um padrão de crescimento de *C. albicans* semelhante para todos os grupos experimentais, entretanto, houve diferença significativa entre os grupos no tempo de 4 h.

Tabela 4 - Média e desvio-padrão dos valores de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* (Log_{10}) obtidos nos ensaios realizados nos diferentes grupos experimentais

Tempo (h)	Controle PBS	Interação Célula	Interação Sobrenadante	*Valor de P
0	5,87 \pm 0,20	5,85 \pm 0,12	6,06 \pm 0,25	0,399
4	4,59 \pm 0,14	5,27 \pm 0,14	4,17 \pm 0,16	0,0003
8	4,68 \pm 0,04	4,83 \pm 0,09	4,78 \pm 0,29	0,592
12	6,06 \pm 0,03	5,97 \pm 0,31	6,11 \pm 0,11	0,691

*Valores de P obtidos na comparação dos grupos experimentais (Teste ANOVA, $p \leq 0,05$)

5.2.4 Análise histológica de *G. mellonella*

Os cortes histológicos foram obtidos a partir do corpo de gordura de *G. mellonella*, nos quais foi avaliado a presença de leveduras e hifas coradas pela técnica do PAS. Foram analisados os seguintes grupos experimentais: Controle PBS, Controle BHI, Interação Célula e Interação Sobrenadante.

As Figuras 13 e 14 representam os cortes histológicos corados com PAS dos diferentes grupos experimentais. Podemos notar que leveduras e hifas estão agrupadas e presentes em diversos pontos dos cortes histológicos (Figura 14 A). A localização destes agrupamentos não foi a mesma em todos os cortes, podendo estar localizados próximo aos órgãos ou infectando o tecido adiposo de *G. mellonella*.

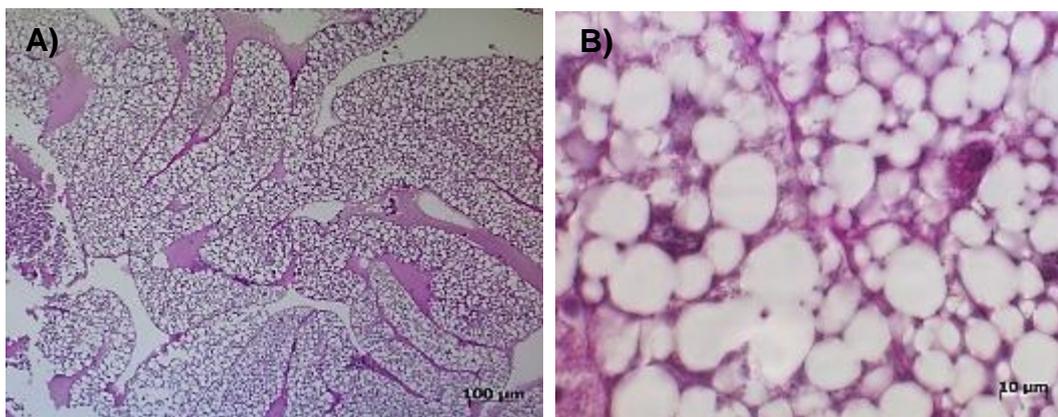


Figura 13 – Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* sem infecção por *C. albicans*, mostrando o aspecto normal do corpo de gordura. Aumentos originais A) 100x e B) 1000x.

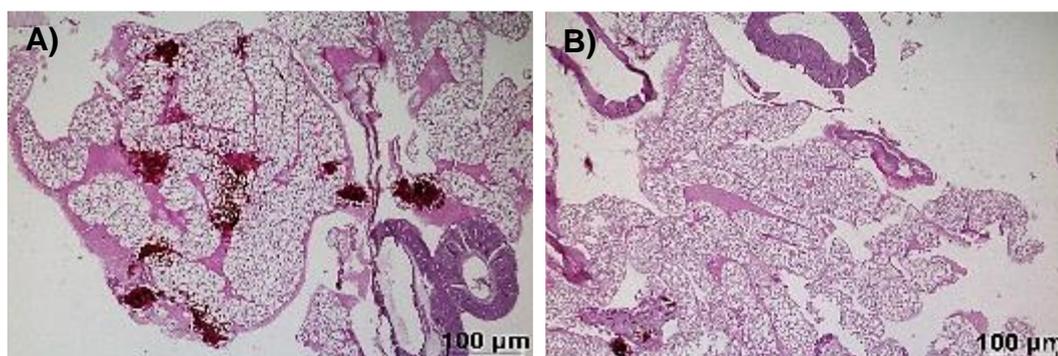


Figura 14 – Cortes histológicos do corpo do gordura de *G. mellonella* infectados por *C. albicans* comparando diferentes grupos experimentais: A) Controle PBS (*C. albicans* e PBS) e B) Interação de *C. albicans* com sobrenadante de *S. mutans*. A partir das imagens podemos observar redução da formação de hifas na Figura B em relação à Figura A, mostrando que o sobrenadante de *S. mutans* reduziu a filamentação de *C. albicans in vivo*. Aumentos originais: 100x.

As médias e desvio padrão dos grupos analisados estão apresentados na Figura 15. Através dessa análise, verificou-se haver diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) apenas para o grupo Interação Sobrenadante em relação aos demais, e assim como nos testes *in vitro*, pode observar que o sobrenadante da cultura de *S. mutans* inibiu a transição morfológica de *C. albicans*.

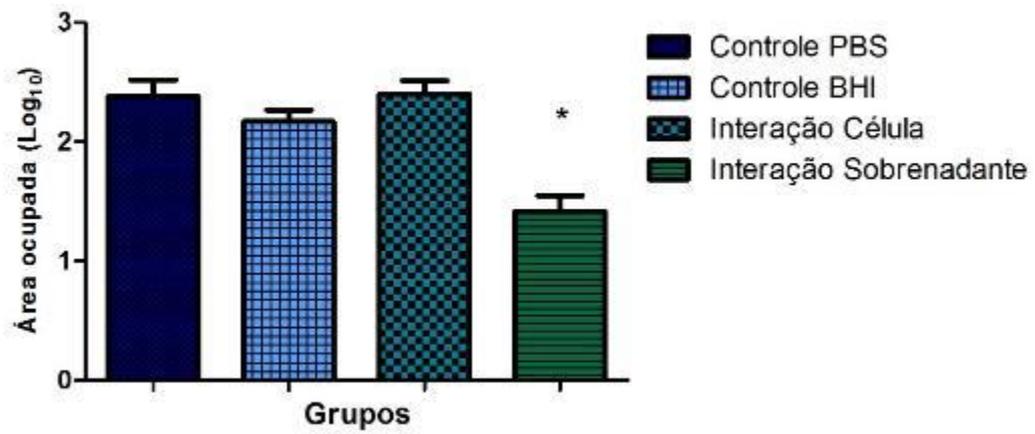


Figura 15 - Média e desvio padrão da área ocupada (Log₁₀) por hifas e/ou leveduras nos diferentes grupos experimentais após 18 h de infecção.

6 DISCUSSÃO

A interação entre bactérias e fungos em biofilmes mistos tem sido associada com redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas por bactérias, pela transferência direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes. Outro mecanismo de interação entre bactérias e fungos é a modificação nas condições ambientais, como a mudança no pH, que pode influenciar a formação de hifas por *C. albicans*. Além destas interações antagônicas, interações mutuamente benéficas em biofilmes mistos também tem sido observadas, nas quais as diferentes espécies podem fornecer proteção uma para outra contra o sistema imunológico ou aos agentes antimicrobianos (Peleg et al., 2010).

No presente estudo, a interação microbiana entre *S. mutans* e *C. albicans* foi avaliada em testes *in vitro* (através da formação de biofilme, análise da transição morfológica em MEV e na capacidade de filamentação por *C. albicans*) e *in vivo* (análise da curva de sobrevivência, cultura da hemolinfa e análise histológica do corpo de gordura de *G. mellonella*). Em todos os testes, foram estudados os efeitos diretos das células de *S. mutans* e também seus efeitos indiretos, utilizando apenas o sobrenadante da sua cultura.

Inicialmente utilizamos *S. mutans* em diferentes fases da cultura bacteriana (4, 6, 18 e 24 h) para determinar qual destes tempos de crescimento melhor interferiu na formação de biofilme por *C. albicans*. Nossos resultados demonstraram que houve aumento estatisticamente significativo do número de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* em relação ao grupo controle quando associada com as células de *S. mutans* para todos tempos testados (Tabela 1), aumentando 1,28, 1,38, 1,52 e 1,43 Log_{10} na

contagem de UFC/mL de *C. albicans* para os tempos de cultura de *S. mutans* de 4, 6, 18 e 24 h respectivamente.

Ainda analisando o melhor tempo de crescimento da cultura bacteriana, também foram analisados os efeitos indiretos de *S. mutans* utilizando apenas o sobrenadante de sua cultura, onde pode-se observar efeito inibitório do sobrenadante sobre biofilme de *C. albicans* em todos os tempos testados, reduzindo 0,80, 0,78, 0,50 e 0,72 Log₁₀ na contagem de UFC/mL de *C. albicans* para os tempos de cultura de *S. mutans* de 4, 6, 18 e 24 h respectivamente.

A partir destes resultados, o tempo de 4 h de cultura de *S. mutans* foi adotado para todos os testes subsequentes, já que neste determinado tempo, houve maior inibição (0,80 Log₁₀) na formação de biofilme de *C. albicans* quando em contato com o sobrenadante de *S. mutans* e menor aumento (1,28 Log₁₀) na formação de biofilme quando *C. albicans* esteve em contato direto com as células de *S. mutans*, comparado aos outros tempos de cultura.

Diante desses resultados, foi verificado neste estudo que as células de *S. mutans* favorecem a formação de biofilme por *C. albicans*. Assim como nossos resultados, a literatura tem mostrado que nas interações entre *C. albicans* e *S. mutans*, as células de *S. mutans* favorecem a formação de biofilme por *C. albicans*. Thein et al. (2006) avaliaram o efeito de oito espécies de bactérias comensais da cavidade oral sobre formação de biofilme *in vitro* por *Candida albicans*. As bactérias estudadas foram *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus intermedius*. Co-cultura de *C. albicans* com cada uma destas bactérias resultaram em uma redução na formação do biofilme de *Candida*, exceto para *S. mutans* e *S. intermedius*, que resultaram numa associação benéfica favorecendo a formação de biofilme por *C. albicans*.

Em 2007, Barbieri et al. avaliaram *in vitro* a capacidade da aderência de cepas de *S. mutans* e *C. albicans* de forma isolada ou em associação, mostrando que esses micro-organismos quando juntos, apresentam maior aderência à superfície dentária, formando uma relação de mutualismo, demonstrando também que a presença de *S. mutans* está associada com o aumento na formação do biofilme por *C. albicans*.

Esta mesma relação entre *S. mutans* (UA 159) e *C. albicans* (ATCC 90028) também foi demonstrada por Pereira-Cenci et al. (2008), que estudaram esta interação através de biofilmes formados *in vitro* sobre diferentes substratos: hidroxiapatita, polimetilmetacrilato (PMMA) e material de reembasamento protético *soft liner*, sugerindo que esses micro-organismos estabelecem uma relação de mutualismo, estimulando o crescimento de ambas as espécies e formando co-agregações que aumentam o processo de adesão. Em todas as condições testadas, a presença das células de *S. mutans* aumentou o crescimento de *C. albicans*.

Em contrapartida, verificamos que o sobrenadante de *S. mutans* teve efeitos inibitórios sobre a formação de biofilme por *C. albicans*, sugerindo *S. mutans* secretam subprodutos no meio de cultura com ação antifúngica. Nesse estudo, o sobrenadante de *S. mutans* também apresentou ação inibitória sobre a morfogênese de *C. albicans*. No teste de filamentação, verificou-se redução na formação de hifas no grupo Interação Sobrenadante quando comparado aos demais grupos (Interação Célula, Controle PBS e Controle BHI).

A formação de hifas parece ser um dos pontos críticos para formação de biofilme de *C. albicans*, pois estudos demonstraram que mutações nos genes relacionados com a formação de hifas resultaram em graves defeitos na formação do biofilme *in vitro* (Nobile, Mitchell, 2005, 2006; Fuchs et al., 2010).

Em determinadas interações, moléculas secretadas por bactérias no meio externo podem determinar a inibição do crescimento de uma segunda espécie (Martins et al., 2007; Walencka et al., 2008;

Sadowska et al., 2010). Este resultado pode ser explicado pelo potencial de *S. mutans* inibir outras espécies microbianas através de competição para manter seu nicho, produzindo um peptídeo regulador chamado mutacina (Kreth et al., 2006) que é capaz de inibir a transição morfológica do patógeno *C. albicans* de levedura para a forma filamentosa (Wu et al., 2010).

Pereira-Cenci et al. (2008) estudaram a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em biofilmes formados *in vitro* sobre diferentes substratos e verificaram que *S. mutans* suprimiu a formação de hifas por *C. albicans*. Jarosz et al. (2009) avaliaram a interação entre *S. mutans* UA 159 e *C. albicans* em relação às moléculas de comunicação secretadas (*quorum-sensing*). *S. mutans* inibiu a formação de tubo germinativo por *C. albicans* em culturas mistas e até mesmo quando ele foi fisicamente separado de *C. albicans*.

Em 2010, Joyner et al. demonstraram que *S. mutans* inibiu a formação de micélio por *C. albicans* quando essas espécies foram cultivadas conjuntamente por 16 h. Esses autores atribuíram os efeitos inibitórios na formação de hifa a um peptídeo natural produzido por *S. mutans*, o mutanobactin A.

Também em 2010, Vílchez et al. identificaram o ácido trans-2- decenóico, composto excretado por *S. mutans* que é capaz de suprimir a transição de levedura para hifas em concentrações que não afetam o crescimento. A expressão de HWP1, gene específico para formação de hifas de *C. albicans* foi anulado pelo ácido trans -2- decenóico, impedindo assim transição morfológica de *C. albicans*.

Em outro teste realizado neste estudo, a formação de biofilmes monotípicos de *C. albicans* e heterotípicos de *C. albicans* e *S. mutans* sobre corpos de prova de acrílico foi comprovada pela análise de MEV, onde foi possível identificar estruturas presentes no biofilme maduro, como presença de matriz polimérica extracelular e canais de água responsável pela nutrição e excreção de metabólitos do biofilme. Os grupos

experimentais foram avaliados quanto à morfologia e através das imagens do biofilme formado no grupo Interação Sobrenadante, verificou-se que o sobrenadante de *S. mutans* também inibiu a formação de hifas por *C. albicans* neste teste.

Metwalli et al., 2013 também observaram em MEV biofilmes mistos e maduros de *C. albicans* e *S. mutans* formados em dentes humanos extraídos. As células microbianas estavam incorporadas numa matriz de substância polimérica extracelular com canais de água, através da qual o líquido flui para distribuir nutrientes e moléculas de sinalização que facilitam a comunicação entre a célula. Diferentemente do nosso estudo, estes autores não avaliaram a interferência de *S. mutans* sobre a filamentação de *C. albicans*.

Em síntese, todos os testes realizados *in vitro* sugerem que *S. mutans* secretam subprodutos no meio de cultura que apresentam efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, interferindo na sua capacidade de filamentação e formação de biofilme. Para análise dos efeitos de *S. mutans* sobre *C. albicans in vivo*, foi utilizado como modelo experimental lagartas de *G. mellonella*. Este foi o primeiro estudo de infecção experimental realizado neste invertebrado afim de estudar a interação entre *C. albicans* e *S. mutans*.

Sendo assim, foi avaliada primeiramente a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *S. mutans* em diversas concentrações (10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 células/mL) para determinação da concentração sub-letal para este micro-organismo nesses animais. Através dos resultados obtidos, verificou-se que *S. mutans* foi patogênico para *G. mellonella* nas concentrações de 10^6 e 10^7 células/mL, enquanto que as concentrações de 10^4 e 10^5 células/mL de *S. mutans* não causaram infecção no hospedeiro, pois não ocorreu melanização e morte de nenhuma lagarta destes grupos durante todo o experimento. A partir destes dados a concentração sub-letal de 10^5 células/mL de *S. mutans* foi adotada para todos os ensaios

subsequentes, uma vez que esta é a mesma concentração utilizada para a infecção de *C. albicans* em *G. mellonella*.

A seguir, foram realizados outros testes para avaliar os efeitos da interação entre *C. albicans* e *S. mutans* neste modelo de invertebrado, incluindo curva de sobrevivência, contagem de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa e análise histológica. Os resultados da curva de sobrevivência em *G. mellonella* mostraram que os níveis de virulência de *C. albicans* foram dependentes do grupo estudado, sendo que os grupos Controle PBS e Controle BHI foram os mais virulentos, com morte de 100% das lagartas em até 24 h. Quando *C. albicans* foi colocada em contato com células ou sobrenadante de *S. mutans*, verificamos que a sobrevivência das lagartas foi maior em relação aos grupos controles, com diferenças estatisticamente significantes para a associação de *C. albicans* com células e sobrenadante de *S. mutans*.

As taxas de mortalidade e sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* tem sido associada à capacidade de filamentação de *C. albicans*. Matsumoto et al. (2013) estudaram os efeitos de diferentes morfotipos de *C. albicans* na infecção do bicho-da-seda. Foram utilizadas três condições diferentes de células de *C. albicans in vitro* alterando os tempos de incubação. Os diferentes morfotipos estudados foram: Levedura a 0 min de incubação (Y0), Levedura iniciando a formação de tubo germinativo a 60 min de incubação (Y60), e hifas com 120 min de incubação (H120). A taxa de sobrevivência das lagartas não apresentaram diferença entre os grupos Y0 e H120, no entanto, Y60 células apresentaram maior patogenicidade do que os outros 2 tipos de célula, indicando que a transição morfológica a partir de levedura para hifa está envolvida na patogênese, enquanto que as formas de leveduras e hifas não estão.

Fuchs et al. (2010) utilizaram *G. mellonella* como modelo para estudar os papéis da filamentação na virulência de *C. albicans* filamentação em virulência. Os autores avaliaram cinco genes (BCR1, FLO8, KEM1, SUV3 e TEC1) que desempenham importantes papéis na

filamentação. Entre as cinco cepas mutantes testadas, verificou-se que apenas uma delas (*flo8 / flo8*) não formaram hifas no tecido de *G. mellonella*. Esta cepa também apresentou virulência reduzida nas lagartas. Outra cepa testada, a *tec1 / tec1* mostrou patogenicidade reduzida nas lagartas, mas em contrapartida, apresentou capacidade de formar filamentos no hospedeiro. Segundo os autores, a capacidade das cepas mutantes formarem filamentos e apresentarem virulência diminuída mostra que isoladamente a filamentação não é suficiente para matar *G. mellonella*, sugerindo que outros fatores de virulência podem estar associados com os genes que regulam a filamentação.

Outro teste *in vivo* realizado foi a quantificação de UFC/mL de *C. albicans* presente na hemolinfa de *G. mellonella* em diferentes tempos de infecção (0, 4, 8 e 12 h), onde pudemos verificar que houve uma resposta imune da lagarta frente a infecção por *C. albicans*. O número de *C. albicans* recuperado a partir da hemolinfa das lagartas logo após a inoculação (0 h) não diferiu da carga fúngica inoculada para iniciar a infecção, entretanto, nos tempos subsequentes à inoculação (4 e 8 h), observamos maior redução do número de células recuperadas, o que demonstra que o sistema imune da lagarta conseguiu combater a infecção por *C. albicans*, causando redução do número de UFC/mL de *Candida* nestes tempos de infecção. Após estes períodos, *C. albicans* conseguiu vencer o sistema imunológico de *G. mellonella*, atingindo seu pico de proliferação celular (12 h), atingindo concentrações de carga fúngica semelhantes às inoculadas no início do experimento.

Pudemos observar este mesmo comportamento de crescimento fúngico x sistema imunológico em todos grupos estudados, entretanto, no tempo de 4 h, observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo Interação associado com células de *S. mutans* em relação aos outros grupos. Esta diferença pode ter ocorrido porque no grupo Interação Célula, o sistema imunológico de *G. mellonella* teve que responder frente a dois micro-organismos diferentes: *C. albicans* e *S.*

mutans, enquanto que no grupo Controle e grupo Interação Sobrenadante o sistema imune precisou responder apenas contra à infecção monotípica por *C. albicans*.

Em 2013, Chibebe Junior et al. também fizeram coletas temporais da hemolinfa de *G. mellonella* afim de estudar a infecção de *E. faecium* (E007) nestes animais. Foram coletadas hemolinfa nos tempos 0, 2, 4, 8 12 e 24 h após inoculação dos micro-organismos em *G. mellonella*. Os dados da recuperação microbiana mostraram que no tempo de 2 h após a infecção, o número de UFC/mL diminuiu, sugerindo uma resposta imune eficaz no início da infecção, no entanto, 8 h após a infecção, o número máximo de *E. faecium* foi recuperado ($4,8 \times 10^9$ UFC/mL).

Na análise histológica do corpo de gordura de *G. mellonella*, encontramos diferença estatisticamente significativa apenas para o grupo Interação Sobrenadante em relação aos demais grupos, e assim como nos testes *in vitro*, verificamos que o sobrenadante da cultura de *S. mutans* inibiu a transição morfológica de *C. albicans*.

Mesa-Arango et al., 2013 também realizaram estudos de histopatologia para melhor caracterizar o desenvolvimento da infecção em *G. mellonella*. Os autores avaliaram os efeitos da Anfotericina B (AmB) e Fluconazol (FLZ) sobre filamentação de *C. albicans*. A partir da análise dos cortes histológicos, pode-se observar presença de leveduras e hifas, tanto nas lagartas tratadas e não tratadas, principalmente em agregados. No entanto, no grupo das lagartas sem tratamento, pode-se verificar aumento do número de áreas contaminadas em comparação com as lagartas tratadas com AmB ou FLZ. Além disso, no grupo de lagartas tratadas com antifúngicos, foi notada a presença de agregados de células em torno das áreas infectadas, característica que estava ausente nas lagartas não tratadas.

Scorzoni et al., 2013 também avaliaram a histopatologia de *G. mellonella* infectadas com *C. krusei* e *C. albicans* frente ao tratamento com antifúngicos. Foram observados no histológico presença de *C.*

albicans e *C. krusei* tanto na forma de leveduras quanto na forma de hifas. O tratamento com Fluconazol (12mg / kg) diminuiu o número de leveduras de ambas espécies. A Anfotericina B (4 mg / kg) não teve o mesmo efeito que o fluconazol, embora menos leveduras foram encontrados nos grupos submetidos a este tratamento. Os antifúngicos não tiveram efeitos diferente sobre as lagartas infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* e os autores concluíram que o tratamento com o antifúngico por si só não teve efeito na histopatologia das lagartas.

Os resultados obtidos neste estudo tem muito a contribuir para o entendimento das interações microbianas e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a candidose oral, entretanto, estudos moleculares e imunológicos são necessários para compreender em detalhes como as bactérias orais modulam a patogenicidade de *C. albicans*.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- *S. mutans* por meio da liberação de subprodutos no meio, teve efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, tanto na sua capacidade de formação de biofilme quanto na sua alteração morfológica;
- O contato direto das células de *S. mutans* favoreceu a formação de biofilme por *C. albicans*;
- A inoculação das células e do sobrenadante de *S. mutans* em *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* diminuiu o desenvolvimento da candidose experimental;
- O sobrenadante da cultura de *S. mutans* também apresentou efeito inibitório sobre a formação de hifas nos tecidos de *G. mellonella*.
- O modelo experimental de *G. mellonella* foi adequado para estudo da interação entre *C. albicans* e *S. mutans*.

8 REFERÊNCIAS*

Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos JA. The collagen binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun*. 2011;79(6):2277-84.

Alarco AM, Marcil A, Chen J, Suter B, Thomas D, Whiteway M. Immune deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. *J Immunol*. 2004;172(9):5622-8.

Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect*. 2007;9(6):729-34.

Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(5):626-30.

Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect Immun*. 2009;77(9):3696-704.

Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*. 2004 May 1;9:1267-77.

Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*. 2012;3(6):497-503.

Barbieri DSV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*. 2007;38(4):624-31.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [acesso ago. 2008] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1001-9.

Bekal-Si Ali S, Hurtubise Y, Lavoie MC, LaPointe G. Diversity of *Streptococcus mutans* bacteriocins as confirmed by DNA analysis using specific molecular probes. *Gene.* 2002;283(1-2):125-31.

Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 2003;5(15):1389-95.

Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2105-12.

Biswas S, Von Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(2):348-76.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(6):588-94.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34(2):153-7.

Brown AJ. Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. *Candida and candidiasis.* ASM Press. 2002;95-106.

Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East, PD. The Discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2008;38(2):201-12.

Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD. A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009;39(11):792-800.

Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms *in vitro*. *Angle Orthod.* 2007;77(2):331-6.

Brusca MI, Irastorza RM, Cattoni DI, Ozu M, Chara O. Mechanisms of interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: An

experimental and mathematical modelling study. *Acta Odontol Scand*. 2013;71(3-4):416-23.

Bulet P, Stöcklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*. 2005;12(1):3-11.

Buzzini P, Martini A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3362-4.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327-35.

Cardoso BC. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* [dissertação]. Braga: Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho Braga; 2004.

Chaffin WJ, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(1):130-80.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(1):42-55.

Champion OL, Cooper IA, James SL, Ford D, Karlyshev A, Wren BW, et al. *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*. 2009;155(Pt 5):1516-22.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One*. 2013; 8(2):e55926.

Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*. 2010;5(3):321-32.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599-607.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 27(2):163-9.

Cottier F, Muhlschlegel FA. Sensing the environment: Response of *Candida albicans* to the X factor. FEMS Microbiol Lett. 2009;295(1):1-9.

Crawford JM, Clardy J. Bacterial symbionts and natural products. Chem Commun (Camb). 2011;47(27):7559-66.

Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastro ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. Acta Odontol Latinoam. 2010;23(1):20-6.

Cytrynska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. Peptides. 2007;28(3):533-46.

D'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. Curr Drug Targets. 2006;7(4):465-70.

De Keersmaecker SC, Sonck K, Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. Trends Microbiol. 2006;14(3):114-9.

De Rossi T, Lozovoy MAB, da Silva RV, Fernandes EV, Geraldino TH, Costa IC, et al. Interactions Between *Candida albicans* and Host. Sem: Ciênc Biol Saúde. 2011;32(1):15-28.

Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of anti *staphylococcal* agents. J Antimicrob Chemother. 2011;66(8):1785-90.

Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilms infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6(2):201-8.

Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat Rev Immunol. 2007;7(11):862-74.

Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. J Dent Res. 2010;89(1):8-18.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microb Infect. 2010;12(6):488-96.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. Curr Opin Microbiol. 2006;9(4):346-51.

Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun*. 2012;80(3):1015-24.

Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today*. 2009;14(3-4):214-22.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte JA. Selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1973;18(11):1357-64.

Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in the interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and experimental pellicle formed on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6357-67.

Grönroos L. Quantitative and qualitative characterization of *mutans Streptococci* in saliva and in the dentition [dissertation]. Helsinki: Faculty of Medicine of the University of Helsinki; 2000.

Hromatka BS, Noble SM, Johnson AD. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):4814-26.

Huang WC, Chen YY, Teng LJ, Lien HT, Chen JY, Chia JS. Chromosomal inversion between *rmn* operons among *Streptococcus mutans* serotype c oral and blood isolates. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 2):198-206.

Jakubovics NS. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. *Mol Oral Microb*. 2010;25(1):4-14.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*. 2000;182(13):3843-5.

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

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 2006;211(4):213-36.

Jong AY, Stins MF, Huang S-H, Chen SHM, Kim KS. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier *in vitro*. *Infect Immun*. 2001; 69(7):4536-44.

Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cel Microb*. 2009; 11(7):1007-15.

Joyner PM, Liu J, Zhang Z, Merritt J, Qi F, Cichewicz RH. Mutanobactin A from the human oral pathogen *Streptococcus mutans* is a cross-kingdom regulator of the yeast-mycelium transition. *Org Biomol Chem*. 2010;8(24): 5486-9.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JMAH, Vilela SFG, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar *in vitro* biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiology*. 2011;11:247.

Kamiya RU, Hofling JF, Gonçalves RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. *J Med. Microbiol*. 2008;57(Pt 5):626-35.

Khush RS, Leulier F, Lemaitre B. *Drosophila* immunity: two paths to NF- κ B. *Trends Immunol*. 2001;22(5):260-4.

Kim CH, Lee JH, Kim I, Seo SJ, Son SM, Lee KY. Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Mol Cells*. 2004;17(2):262-6.

Klein MI, Bang S, Florio FM, Hofling JF. Genetic diversity of competence gene loci in clinical genotypes of *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):3015-20.

Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, Schroppel K, Naglik JR, et al. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol*. 2005;15(22):2021-6.

Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res*. 2011;45(2):100-6.

Knight SAB, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferring by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun*. 2005;73(9):5482-92.

Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-80.

Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(3):17-8.

Kreth J, Merritt J, Zhu L, Shi W, Qi F. Cell density and ComE-dependent expression of a group of mutacin and mutacin-like genes in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;265(1):11-7.

Kuleta JK, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, Warszawa. 2009;56(2):211-24.

Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(4):653-70.

Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;32(10):1295-309.

Leclerc V, Reichhart JM. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev*. 2004;198:59-71.

Lee YS, Yun EK, Jang WS, Kim I, Lee JH, Park SY, et al. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol Biol*. 2004;13(1):65-72.

Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008;154(Pt 11):3247-55.

Lima TD, Fernandes OFL, Souza HLK, Passos SX, Silva MRR. *Candida albicans* de mucosa vaginal: morfotipagem e produção de proteinase. *Rev Patol Trop*. 2004;33(1):65-70.

Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts - New tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence*. 2011; 2(6):521-7.

Machado I, Lopes SP, Sousa AM, Pereira MO. Adaptive response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms to benzalkonium chloride. *J Basic Microbiol*. 2012;52(1):43-52.

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(10):1129-36.

Mansfield BE, Dionne MS, Schneider DS, Freitag NE. Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila Melanogaster*. *Cell Microbiol*. 2003;5(12):901-11.

Marmaras VJ, Lampropoulou M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal*. 2009;21(2):186-95.

Marsh PD. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):7-15.

Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell*. 2007;6(12):2429-36.

Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(2):281-310.

Matsumoto H, Nagao J, Cho T, Kodama J. Evaluation of pathogenicity of *Candida albicans* in germination-ready states using a silkworm infection model. *Med Mycol J*. 2013;54(2):131-40.

Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol*. 2013;51(5):461-72.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathog* 2013;9(10):e1003616.

Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2011;79(7):2638-45.

Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003;(3):219-30.

Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 2003;71(5):2404-13.

Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000886.

Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet.* 2004;363(9403):139-49.

Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect.* 2010;12(2):146-53.

Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect Immun.* 2005;73(7):3833-41.

Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15675-80.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* 2005;73(7):3842-50.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia.* 2008;165(1):1-3.

Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3313-7.

Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):198-202.

Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Hukai T, Yoshioka H, Shudo Y et al. Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 4):551-6.

Napimoga MH, Hofling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Sci. 2005;47(2):59-64.

Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, et al. *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. Mycoses, 2003; 46(11-12):471-8.

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiol. 2006;8(9):1382-91.

Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. Curr Biol. 2005;21;15(12):1150-5.

Okoli I. Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. PLoS One. 2009;4(9):e7025.

Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). Virulence. 2011;2(2):111-9.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010;8(5):340-9.

Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr., Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. Ant Ag Chemother. 2009;53(6):2605-9.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida* associated denture stomatitis: new insights. J Appl Oral Sci. 2008;16(2):86-94.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microb Rev. 2007;20(1):133-63.

Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. Eukaryot Cell. 2009;8(11):1750-8.

Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the *in vivo* anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. Biometals. 2009;22(3):461-7.

Sadowska B, Walencka E, Wieckowska-Szakiel M, Różalska B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 2010;55(5):497-501.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000. 2009;49:39-59.

Schuhmann B, Seitz V, Vilcinskis A, Podsiadlowski L. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2003;53(3):125-33.

Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. *PLoS One.* 2013;8(3):e60047.

Shirliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;299(1):1-8.

Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. Mating and virulence of *Candida albicans*. *Mycologist.* 2003;17:64-9.

Sonnenburg JL, Fischbach MA. Community health care: therapeutic opportunities in the human microbiome. *Sci Transl Med.* 2011; 3(78):78ps12.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun.* 2003;71(9):4862-72.

Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(26):15245-50.

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004;12(7):313-24.

Takahashi N, Nyvard B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294-302.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res.* 2009;88(2):105-15.

Thein ZN, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol. 2006; 51(8):672-80.

Thein ZN, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009;52(6):467-75.

Uppuluri P, Pierce CG, López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. Future Microbiol. 2009;4(10):1235-7.

Van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. Curr Opin Crit Care. 2010;16(5):453-9.

Vílchez R, Lemme A, Ballhausen B, Thiel V, Schulz S, Jansen R, et al. *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). ChemBioChem. 2010;11(11):1552-62.

Walencka E, Różalska S, Sadowska B, Różalska B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. Folia Microbiol. 2008;53(1):61-6.

Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. Clin Infect Dis. 2005; 41 Suppl 6:S389-93.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011 Jan 28. doi:10.3402/jom.v3i0.5771.

Wu C, Cichewicz R, Li Y, Liu J, Roe B, Ferretti J, et al. The genomic island TnSmu2 of *Streptococcus mutans* encodes a NRPS-PKS gene cluster responsible for the biosynthesis of pigments involved in oxygen and H₂O₂ tolerance. Appl Environ Microbiol. 2010;76(17):5815-26.

Yang JY, Karr JR, Watrous JD, Dorrestein PC. Integrating '-omics' and natural product discovery platforms to investigate metabolic exchange in microbiomes. Curr Opin Chem Biol. 2011;15(1):79-87.

Yasmin A, Kenny JG, Shankar J, Darby AC, Hall N, Edwards C. Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. J Bacteriol. 2010;192(4):1122-30.

Yoshida A, Ansai T, Takehara T, Kuramitsu HK. LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(5):2372-80.

Zijngue V. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One.* 2010;5(2): e9321.

Zimmermann M, Fischbach MA. A family of pyrazinone natural products from a conserved nonribosomal peptide synthetase in *Staphylococcus aureus*. *Chem Biol.* 2010;17(9):925-30.