

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir
de 26/02/2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Carmélia Isabel Vitorino Lobo

Interação de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* em biofilme in vitro

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Carmélia Isabel Vitorino Lobo

Interação de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* em biofilme in vitro

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

Orientadora: Marlise Inêz Klein

Araraquara

2018

Lobo, Carmélia Isabel Vitorino

Interação de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* em biofilme in vitro / Carmélia Isabel Vitorino Lobo. – Araraquara: [s.n.], 2018

69 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

1. Biofilmes 2. *Streptococcus mutans* 3. *Candida albicans*
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Carmélia Isabel Vitorino Lobo

Interação de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* em biofilme in vitro

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

2ª Examinadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa

3ª Examinadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

Araraquara, 26 de Fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

Carmélia Isabel Vitorino Lobo

NASCIMENTO: 25 de fevereiro de 1989 – Cidade de Maputo – Maputo

FILIAÇÃO: Josethe Maria Amado Vitorino e Augusto Francisco Lobo

2006/2010 – Licenciatura em Medicina Dentária pelo Instituto Superior de Ciências e Tecnologia de Moçambique – Moçambique

2011/2014 - Atuação como Médica Dentista no Hospital Rural de Angoche; Responsável de Saúde Oral e Escolar do Distrito de Angoche – Ministério da Saúde de Moçambique;

2014/2016 – Atuação como Médica Dentista no Hospital Central de Nampula - Ministério da Saúde de Moçambique (atualmente com licença para a realização do mestrado).

Especial para ti querida avó Francisca (Chica), pelo carinho, amor, orações que sempre fizeste por mim e por teres me dado a última benção antes da tua partida (o céu ganhou mais uma estrela); a avó Isabel (minha Belinha) pelo amor infinito, sei que do céu me guia e protege; ao avô Luíz pelo exemplo de homem íntegro, pelas conversas e histórias partilhadas (sei que Deus te levou para seres seu melhor e fiel amigo); avô Albano pelo amor e educação; aos meus pais Josethe e Augusto pelo amor, puxões de orelhas e por apoiarem as minhas decisões e estarem sempre do meu lado; à minha irmã Erica pela amizade e por ter se tornado essa menina mulher forte.

Obrigada por acreditarem 'comigo'
Com vocês do meu lado, tudo posso
Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A Deus que está sempre comigo e nunca me falta;

Aos meus pais Josethe Maria Amado Vitorino e Augusto Francisco Lobo por me terem concebido, garantido a minha educação, por darem sempre o seu melhor;

Aos meus avós Francisca Elvira de Sousa Pinto, Isabel Maria Amado Vitorino, Luíz de Gonzaga Lobo e Albano João Vitorino pelo amor, carinho, mimos e cuidados;

A minha irmã Erica Célia Jessen muito paciente;

À minha orientadora Marlise Inês Klein por me aceitar como sua orientada, pela paciência e profissionalismo ao mesmo tempo e pela amizade. Sinto-me honrada por fazer parte do 'team Marlise' e sou muito grata por tudo que fez e faz por mim. O meu carinho e admiração.

A professora Ana Cláudia Pavarina, pela carta de aceite;

As professoras Janaína Habib Jorge e Josimeri Hebling Costa, por terem participado da minha banca de qualificação;

As professoras Cristiane Duque e Josimeri Hebling Costa, por terem gentilmente aceito fazer parte da minha banca de defesa;

Ao Hospital Central de Nampula, Direção Provincial de Nampula e Ministério da Saúde de Moçambique por permitirem que eu continuasse com os estudos;

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara;

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

Ao Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do Microscópio de Fluorescência Confocal.

A todos os professores; técnicos e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara (em especial aos do Programa de Reabilitação Oral);

Ao José Alexandre Garcia, Tarcísio Rodrigues da Silva, Cristiano Lamounier e Renan César Palomino pelas orientações antes e após a minha chegada ao Brasil;

Ao 'team Marlise' pelo companheirismo em especial ao Guilherme Roncari Rocha e ao Elkin Jahir Florez Salamanca pelo treinamento, amizade e paciência;

A Luana Sales pela colaboração e parceria;

A Paula Aboud Barbugli pela colaboração;

As minhas queridas alunas de iniciação científica Chiara Mikaella Somogyi Christiano (Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico PIBIC/CNPq) e Talita Baptista Rinaldi (Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa FAPESP 2016/108338);

A Maria Inês Carlos pelo carinho e amizade;

Aos meus queridos amigos gringos pelos momentos partilhados, minha família estrangeira;

Aos meus queridos amigos brasileiros, que me receberam e acolheram, estão no meu coração;

Ao Lucas Portela Oliveira, meu grande amigo em Araraquara, pelas conversas, risadas, trocas, o meu muito obrigado por tudo.

Aos meus familiares e amigos moçambicanos e estrangeiros espalhados pelo mundo pela força.

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico Profissional de Moçambique pela concessão e financiamento da Bolsa de mestrado.

Lobo CIV. Interação de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* em biofilme in vitro [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O objetivo foi avaliar quais são os mecanismos de *Streptococcus mutans* e de *Candida albicans* que contribuem para aumentar a patogenicidade do biofilme misto. Biofilmes mistos e simples das cepas *S. mutans* UA159 (Sm) e *C. albicans* SC5314 (Ca) foram formados sobre discos de hidroxiapatita com película salivar, na presença de sacarose. O pH do meio de cultura foi aferido em diversas fases de desenvolvimento do biofilme. Após 43h de crescimento, foram realizadas análises bioquímicas (peso seco, proteínas, composição da matriz extracelular) e de população microbiana. A estrutura dos biofilmes foi avaliada por microscopia confocal em 19 e 43h. A expressão de genes de vias metabólicas de ambas espécies foi verificada em 28h. Os dados foram avaliados por métodos estatísticos considerando $\alpha=0,05$. Verificou-se diferença do pH do meio para os três biofilmes nos tempos 19, 27 e 43h ($p<0,001$; ANOVA dois critérios, Tukey). Biofilmes de Sm e misto foram mais ácidos em 19 e 43h, enquanto biofilmes de Ca mantiveram o pH neutro ($p>0,05$). As quantidades do peso seco e de proteínas de biofilme misto foram maiores comparadas aos biofilmes simples, e menores para Ca ($p=0,001$; ANOVA um critério). Não houve diferença na quantidade de exopolissacarídeos solúveis entre biofilmes Sm e misto, porém o biofilme Ca apresentou menor quantidade ($p<0,001$; Kruskal-Wallis, Dunn). Houve maior quantidade de exopolissacarídeos insolúveis em biofilme misto ($p=0,002$). Verificou-se mesmo comportamento populacional para Sm em biofilmes mistos e simples ($p=0,404$; Mann Whitney); porém, para Ca o biofilme misto apresentou maior população versus o simples ($p<0,001$; Teste t). Em 43h, a estrutura tridimensional demonstrou microcolônias maiores em biofilmes mistos comparado à Sm, e ausência dessas estruturas em biofilme simples de Ca. Em biofilmes mistos, as células de Ca estavam localizadas ao redor de conjuntos de células de Sm. Ainda, a distribuição de exopolissacarídeos insolúveis derivados de exoenzimas de Sm foi diferente em biofilmes mistos e simples de Sm. Em 19h, a presença de polissacarídeos derivados de Ca foi melhor observado em biofilme simples de Ca comparada ao biofilme misto. Em 28h, a expressão dos genes de Sm *gtfB* (síntese de exopolissacarídeos insolúveis) e *nox1* (estresse oxidativo) foi maior em biofilme simples de Sm ($p\leq 0,021$); não houve diferença para a expressão de *atpD* (estresse ácido). Para Ca, o nível de expressão dos genes de BGL2 e PHR1 (síntese de polissacarídeos), SOD1 (estresse oxidativo) também foi maior em biofilme simples ($p\leq 0,043$); e não houve diferença para PHR2 (estresse ácido). Assim, a fase em que a expressão gênica foi avaliada demonstrou que biofilmes simples de ambas espécies apresentaram maior atividade metabólica em relação ao biofilme misto. Portanto, a associação de Sm e Ca resulta em maior complexidade funcional e organização tridimensional de biofilmes mistos (comparados à simples) via produção de exopolissacarídeos pelas duas espécies, mas principalmente por Sm.

Palavras – chave: Biofilmes. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

Lobo CIV. Interaction of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in in vitro biofilms [Masters Dissertation]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the mechanisms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* that contribute to increasing the pathogenicity of the mixed-species biofilm. Mixed and single-species biofilms of the strains *S. mutans* UA159 (Sm) and *C. albicans* SC5314 (Ca) were formed on saliva-coated hydroxyapatite discs in the presence of sucrose. The pH values of the culture media were verified at distinct developmental phases of biofilms. After 43h of growth, the biofilms were subjected to distinct assays biochemical (dry weight, proteins, the composition of extracellular matrix) and microbiological (colony forming units), analyzes. The biofilm's structure was verified via confocal microscopy at 19 and 43h. Gene expression of metabolic ways from both species was evaluated at 28h. The data were assessed by statistical methods ($\alpha=0,05$). There was a difference in the media pH for the three biofilms at times 19, 27 and 43h ($p<0,001$; two-way ANOVA, Tukey). Sm and mixed-species biofilms were acidic at 19 and 43h, while Ca biofilms maintained a neutral pH ($p>0,05$). The amounts of dry weight and proteins were higher for mixed-species biofilm compared to single-species biofilms, being lower for Ca ($p=0,001$; one-way ANOVA). The quantity of soluble exopolysaccharides was similar for Sm and mixed-species biofilms but Ca presented a lower amount than those biofilms ($p<0,001$; Kruskal-Wallis, Dunn). There was a higher amount of insoluble exopolysaccharides in mixed-species biofilm ($p=0,002$). There was no difference in Sm population in single- and mixed-species biofilms ($p=0,404$; Mann Whitney); however, the mixed-species biofilm presents a higher population of Ca versus the single-species biofilm ($p<0,001$; t-Test). The three-dimensional structure analysis showed larger microcolonies in mixed-species biofilms versus Sm biofilm, and absence of these structures in Ca biofilm. In mixed-species biofilms, Ca cells were located around clusters of Sm cells. Also, distribution of exopolysaccharides was different in mixed-species and Sm biofilms, but this component was not present in Ca biofilms. The presence of Ca-derived polysaccharides was better observed in single-species biofilms (versus mixed-species biofilms). In 28h gene expression levels of Sm, *gtfB* (insoluble exopolysaccharides) and *nox1* (tolerance to oxidative stress) were higher for Sm single-species biofilm ($p=0,021$; $p<0,001$); while there was no difference for *atpD* (tolerance to acid stress). The expression level of Ca genes BGL2 and PHR1(polysaccharides), and SOD1 (tolerance to oxidative stress) were also higher for Ca single-species biofilm ($p=0,043$; $p=0,005$; $p<0,005$); while PHR2 (tolerance to acid stress) was similar for both biofilms. Thus, the gene expression phase evaluated indicates lower metabolic activity in both single-species biofilms in comparison with the mixed-species biofilm, which presents higher amounts of metabolic products (e.g., insoluble exopolysaccharides). Therefore, the association of Sm and Ca results in greater functional complexity and three-dimensional organization of mixed-species biofilms (versus single-species biofilms) via production of exopolysaccharides by both species, primarily by Sm.

Keywords: Biofilms. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Cárie Dentária	15
3.2 Epidemiologia da Cárie Dentária	15
3.3 Interação entre <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> para a formação de biofilme.....	16
3.4 Outros Fatores de Virulência	25
4 MATERIAL E MÉTODO	29
4.1 Formação de Biofilmes in vitro	29
4.2 Análises dos Biofilmes	32
4.2.1 Análises bioquímicas (colorimétricas) e método microbiológico.....	32
4.2.2 Organização estrutural tridimensional do biofilme via microscopia confocal de varredura a laser.....	34
4.2.3 Expressão gênica de <i>S. mutans</i> e de <i>C. albicans</i>.....	36
4.2.3.1 Isolamento de RNA.....	38
4.2.3.2 Síntese de cDNA.....	39
4.2.3.3 Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR ...	39
4.3 Análise Estatística.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 pH do Meio de Cultura	42
5.2 População Microbiana	43
5.3 Peso Seco (Biomassa ou peso seco insolúvel)	43
5.4 Proteínas no Biofilme.....	44
5.5 Exopolissacarídeos na Matriz Extracelular.....	45

5.6 Estrutura Tridimensional dos Biofilmes.....	46
5.7 Expressão Gênica de <i>S. mutans</i> e de <i>C. albicans</i> em Biofilmes	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO	64

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa e de natureza biofilme-dieta-dependente, caracterizada pela desmineralização dos dentes por ação de ácidos produzidos por microrganismos via metabolização de carboidratos da dieta e associada à higiene deficiente¹. Os biofilmes são comunidades de células microbianas altamente dinâmicas, estruturadas e organizadas; as células estão cobertas e imersas em uma matriz extracelular (MEC) tridimensional (3D) de substâncias poliméricas tais como exopolissacarídeos (EPS), proteínas e ácidos nucleicos². EPS são os principais componentes da matriz de biofilmes cariogênicos, sendo reconhecidos como fatores de virulência essenciais para o desenvolvimento da cárie³⁻⁵. Porém, outros constituintes como DNA extracelular (eDNA) e ácidos lipoteicóicos (ALT) extracelulares são detectados em quantidades elevadas em biofilmes cariogênicos^{6,7}.

A bactéria *Streptococcus mutans* é o principal microrganismo associado a presença de cárie, pois coordena a construção do biofilme cariogênico controlando a formação da MEC rica em EPS insolúveis⁸, além de ser acidogênico (produtor de ácido) e acidúrico (sobrevive em ambiente ácido)^{9,10}. EPS insolúveis dificultam a neutralização pela saliva dos ácidos produzidos pelos microrganismos, levando a desmineralização do esmalte e da dentina¹¹. Ainda, o fungo *Candida albicans* também tem sido encontrado frequentemente em números elevados de unidades formadoras de colônia (UFC / mL) em biofilmes cariogênicos (por exemplo em biofilmes de cárie precoce da infância)¹²⁻¹⁵. Esta espécie de fungo também é acidogênica (produz ácido pirúvico, ácido acético, ácido málico) e acidúrica, o que pode contribuir para a cariogenicidade do biofilme¹⁶.

Uma associação bactéria-fungo pode ser de comensalismo cooperativa ou antagonista. É cooperativa quando os microrganismos fornecem substratos e/ou metabólitos ou estimulam o crescimento um do outro. Por exemplo, *C. albicans* não metaboliza a sacarose com eficiência, sendo beneficiada por produtos degradados da sacarose por *S. mutans* (glicose e frutose); por outro lado, a presença de *C. albicans* no biofilme, altera o ambiente físico do mesmo, propiciando o aumento de EPS e conseqüentemente, o acúmulo e formação de microcolônias por *S. mutans*¹⁷. *S. mutans* produz exoenzimas glicosiltransferases (Gtfs) que são responsáveis por produzir EPS. Na presença de sacarose, existe aumento de EPS produzido por Gtfs sobre as superfícies dentárias e microbianas, promovendo ligações fortes com

diversos microrganismos garantindo a formação e coesão do biofilme¹⁸. Essas ligações entre EPS e *S. mutans* são mais fortes porque essa espécie possui proteínas responsáveis pela organização estrutural de EPS – as proteínas ligantes de glicano ou *glucan binding proteins*: GBPs)⁸.

C. albicans e *S. mutans* tem interação simbiótica mediada pelas exoenzimas Gtfs, principalmente GtfB, além disso, a presença da *C. albicans* em biofilmes mistos induz a expressão de genes *gtfs* de *S. mutans*^{18,19}. Esta interação única aumenta a capacidade de ambos os organismos colonizarem os dentes, aumentando drasticamente a quantidade de EPS na matriz do biofilme, e sinergisticamente potencializando a virulência e a ocorrência de lesões de cárie severa (similares às lesões em cárie precoce da infância) em um modelo animal da doença²⁰. É conhecida a participação de *C. albicans* na formação e patogenicidade do biofilme, no entanto, existe a necessidade de um entendimento mais avançado da patogênese dessa doença, quando esse fungo está presente, para o desenvolvimento de novas terapias efetivas.

Por outro lado, um estudo *in vitro* sugeriu que *C. albicans* poderia prevenir a cárie dentária ao aumentar pH do meio (reduzindo a perda de minerais da estrutura dentária). Isso ocorre porque ao metabolizar sacarose, este fungo produz etanol (que não influencia no pH do meio), e em períodos de escassez/hipóxia é forçado a utilizar o ácido láctico como fonte de carbono (energia), corroborando com a eliminação de ácidos em biofilmes mistos e consequente redução da desmineralização dentária²¹. Entretanto, este estudo é o único a propor uma relação antagonista entre *S. mutans* e *C. albicans*, e essa discrepância pode ser devida aos modelos *in vitro* utilizados.

Assim, este estudo objetivou investigar os mecanismos pelos quais a matriz EPS e outras vias metabólicas induzidas quando estas duas espécies estão juntas, visando fornecer informações adicionais no processo da doença (i.e., patogenicidade). Este conhecimento é importante para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas.

7 CONCLUSÃO

A associação de *S. mutans* e *C. albicans* resulta em maior complexidade funcional e organização 3D de biofilmes mistos via produção de exopolissacarídeos pelas duas espécies, mas principalmente por *S. mutans*.

REFERÊNCIAS*

1. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017; 32 (1): 24-34.
2. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (9): 623-33.
3. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun.* 1993; 61 (9): 3811-7.
4. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Rest.* 2000; 79 (6): 1371-7.
5. Vacca-Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res.* 2007; 41 (6):445-50.
6. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 1-8.
7. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG, Terekhov A, Hamaker BR, et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2017; 1-19.
8. Bowen WH, Koo H. Biology of *streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45 (1): 69-86.
9. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44 (2): 331-84.
10. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50 (4): 353-80.
11. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (4): 7-9.
12. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006; 51 (11): 1024-8.
13. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candida carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010; 44 (3): 272-6.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2012; 57 (8): 1048-53.
15. Xiao J, Moon Y, Li L, Rustchenko E, Wakabayashi H, Zhao X, et al. *Candida albicans* carriage in children with severe childhood caries (S-ECC) and maternal relatedness. *PLoS One.* 2016; 11 (10): 1-16.
16. Klinké T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009; 43 (2): 83-91.
17. Kim D, Sengupta A, Niepa THR, Lee B-H, Weljie A, Freitas-Blanco VS, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep.* 2017; 7: 41332.
18. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77 (18): 6357-67.
19. Hwang G, Marsh G, Gao L, Waugh R, Koo H. Binding force dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *Candida albicans*. *J Dent Res.* 2015; 94 (9): 1310-7.
20. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82 (5): 1968-81.
21. Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog Dis.* 2016; 74 (5): ftw039.
22. Selwitz RH, Ismail AL, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369 (9555): 51-9.
23. Schwendicke F. Contemporary concepts in carious tissue removal: a review. *J Esthet Restor Dent.* 2017; 29 (6): 403-8.
24. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix. *J Dent Res.* 2013; 92 (12): 1065-73.
25. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries and risk factors. *J Dent Res.* 2017; 96 (4): 380-7.
26. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010. *J Dent Res.* 2013; 92 (7): 592-7.
27. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A systematic review and meta-analysis. 2014; 93 (7 Suppl): 20-8S.

28. Islam B. Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit.* 2007; 13 (11): 196-203.
29. Leong PM, Gussy MG, Barrow S-YL, de Silva-Sanigorski A, Waters E. A systematic review of risk factors during first year of life for early childhood caries. *Int J Paediatr Dent.* 2012; 23 (4): 235-50.
30. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88 (11): 982-90.
31. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 22 (2): 94-100.
32. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Rest.* 2011; 90 (3): 294-303.
33. Berkowitz RJ, Turner J, Hughes C. Microbial characteristics of the human dental caries associated with prolonged bottle-feeding. *Arch Oral Biol.* 1984; 29 (11): 949-51.
34. Milnes AR, Bowden GH. The microflora associated with developing lesions of nursing caries. *Caries Res.* 1985; 19 (4): 289-97.
35. 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.
36. Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (1): 81-7.
37. Berkowitz RJ, Koo H, McDermott MP, Whelehan MT, Ragusa P, Kopycka-Kedzierawski DT, et al. Adjunctive chemotherapeutic suppression of mutans streptococci in the setting of severe early childhood caries: an exploratory study. *J Public Health Dent.* 2009; 69 (3): 163-7.
38. Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R, Moore A, Hughes CV, et al. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res.* 2010; 44 (5): 485-97.
39. Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, et al. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun.* 2012; 80 (2):620-32.
40. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *C. albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53 (8): 755-64.
41. 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.

42. Sztajner H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. *ISME J*. 2014; 8 (10): 2256-71.
43. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004; 12 (7): 317-24.
44. Barbieri DSV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Microbiol*. 2007; 38 (4): 624-31.
45. Klinke T Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res*. 2011; 45 (2): 100-6.
46. Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Alvarenga JA, Velloso MS, Prata MCA, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS ONE*. 2016; 11 (3): e0150457.
47. Hwang G, Liu Y, Kim D, Li Y, Krysan DJ, Koo H. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog*. 2017; 13 (6): e1006407.
48. He J, Kim D, Zhou X, Ahn SJ, Burn RA, Richards VP, et al. RNA-Seq reveals enhanced sugar metabolism in *Streptococcus mutans* co-cultured with *Candida albicans* within mixed-species biofilms. *Front Microbiol*. 2017; 8: 1036.
49. Nett JE, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyada K, Hoff B, et al. Putative role of 1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *antimicrob agents chemother*. 2007; 51 (2): 510-20.
50. Nett JE, Sanchez H, Cain M, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug sequestering matrix glucan. *J Infect Dis*. 2010; 202 (1): 171-5.
51. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, D'ENFERT C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54 (5): 2096-111.
52. Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2010; 109 (1): 128-36.
53. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, et al. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (8): e1002848.
54. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*. 2014; 5 (4): e01333-14.
55. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of gtfB, gtfC and gbpB and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23 (6): 466-73.

56. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2008; 154 (Pt 11): 3247-55.
57. Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Koo H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45795.
58. Guo L, McLean JS, Lux R, He X, Shi W. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Sci Rep*. 2015; 5: 18015.
59. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS One*. 2011; 6 (12): e28830.
60. Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol*. 2004; 54 (5): 1335-51.
61. Ajdić D, Pham VTT. Global transcriptional analysis of *Streptococcus mutans* sugar transporters using microarrays. *J Bacteriol*. 2007; 189 (14): 5049-59.
62. Derr AM, Faustoferri RC, Betzenhauser MJ, Gonzalez K, Marquis RE, Quivey RG Jr. Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78 (4): 1215-27.
63. Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis*. 2018; 24 (4): 518-26.
64. Fozo EM, Quivey RG Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70 (2): 929-36.
65. Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey RG Jr. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 238 (2): 291-5.
66. Griswold AR, Jameson-Lee M, Burne RA. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol*. 2006; 188 (3): 834-41.
67. Sheng J, Baldeck JD, Nguyen PT, Quivey RG Jr, Marquis RE. Alkali production associated with malolactic fermentation by oral streptococci and protection against acid, oxidative, or starvation damage. *Can J Microbiol*. 2010; 56 (7): 539-47.
68. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; 73 (3): 407-50.
69. Jeon JG, Klein MK, Xiao J, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 228.

70. Röllä G, Ciardi JE, Bowen WH. Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res.* 1983; 91 (3): 186-90.
71. Vacca-Smith AM, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol.* 1998; 43 (2): 103-10.
72. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14 (2): 89-99.
73. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, et al. Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol.* 2008; 53 (11): 1003-10.
74. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 268 (2): 158-65.
75. Melvaer KL, Helgeland K, Rolla G. Some Physical and chemical properties of 'soluble' and 'insoluble' polysaccharides produced by strains of *Streptococcus mutans* and *sanguis*. *Caries Res.* 1972; 6 (1): 79.
76. Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and *lactobacilli*. *Caries Res.* 2009; 43 (2): 83-91.
77. All-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006; 55 (Pt 8): 999-1008.
78. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112 (13): 4092-7.
79. Matsushita M, Janda KD. Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10 (4): 855-67.
80. Rocha G. Avaliação da eficácia de tt-Farnesol liberado por novo sistema de liberação controlada de fármacos contra biofilmes orais patogênicos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.
81. Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Bio.* 2010; 666: 87-102.
82. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192 (12): 3024-32.
83. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (3): 837-41.

84. De Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1998; 66 (7): 3317-25.
85. Feng G, Klein MI, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H. The specific degree-of-polymerization of A-type proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms. *Biofouling*. 2013; 29 (6): 629-40.
86. Alonso GC, Pavarina AC, Sousa TV, Klein MI. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *J Microbiol Methods*. 2018; 147:1-13.
87. Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E, Soll DR. Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability and drug resistance of *Candida albicans* α/α biofilms. *Eukaryot Cell*. 2013; 12 (6): 875-88.
88. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007; 365 (2): 208-14.
89. Klein MI, DeBaz L, Aqidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One*. 2010; 5 (10): e 13478.
90. Klein MI, Xiao J, Heydorn A, Koo H. An analytical tool-box for comprehensive biochemical, structural and transcriptome evaluation of oral biofilms mediated by *mutans streptococci*. *J Vis Exp*. 2011; (47): 1-8.
91. Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods*. 2010; 50 (4): 217-26.
92. Yin JL, Shackel NA, Zerkry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*. 2001; 79 (3): 213-21.
93. Vroom JM, De Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, et al. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65 (8): 3502-11.
94. Guo L, Hu W, He X, Lux R, McLean J, Shi W. Investigating acid production by *Streptococcus mutans* with a surface-displayed pH-sensitive green fluorescent protein. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e57182.
95. Quivey RG jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol*. 2000; 42: 239-74.
96. Smith EG, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res*. 2012; 91 (2): 133-41.