



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

ANA LUIZA DO ROSÁRIO PALMA

**ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans*
NA ASSOCIAÇÃO COM *Streptococcus mitis* E *Streptococcus*
sanguinis in vitro E *in vivo***

2016

ANA LUIZA DO ROSÁRIO PALMA

**ANÁLISE DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans* NA
ASSOCIAÇÃO COM *Streptococcus mitis* E *Streptococcus sanguinis* *in vitro* E *in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade 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 de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Palma, Ana Luiza Do Rosário

Análise de fatores de virulência de *Candida albicans* na associação com *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* in vitro e in vivo / Ana Luiza Do Rosário Palma. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge.

1. *Candida albicans*. 2. *Streptococcus mitis*. 3. *Streptococcus sanguis*. 4. Fatores de virulência. 5. Genes. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

Universidade de Taubaté (UNITAU)

Instituto Básico de Ciências

Campus de Taubaté

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida, por me dar forças e saúde para acordar todos os dias para poder trabalhar e estudar. Sem ele eu nada seria...

A minha amada Vó Pedrina (*in memoriam*) que serviu a área da saúde por mais de 40 anos no setor de Enfermagem. Sei que ela ficaria muito feliz, em saber que a sua neta seguiu seus passos, sendo agente de saúde, com amor ao próximo e paixão pela profissão. Te amo Vó, beijo da sua Luluzica.

A minha mãe Elenice, que foi mãe e pai para mim e minha irmã Iasmin, nos educando, ensinando valores cristãos e honestidade. Só posso definir minha mãe com uma frase de Abraham Lincoln: “Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo: minha mãe”. Te amo menininha, para todo o sempre...

Ao meu amado João Francisco, que é noivo, amigo, confidente, companheiro e eterno namorado. Minha vida mudou faz 8 anos, quando você chegou e tornou tudo que era cinza em cores. Obrigado pela compreensão de ter passado uma graduação em Biomedicina comigo, duas especializações e agora um Mestrado. Obrigado por aceitar essa “vida louca”, chamada docência que eu escolhi para mim, onde não existe final de expediente, feriado e finais de semana, pois sempre levarei para casa, mais trabalho para fazer.

A minha irmã Iasmin Caroline, na qual admiro muito, como profissional que se tornou. A odontologia com certeza teve um grande ganho, você e sua cartilha para pacientes especiais. Saiba que se fui dura com você, foi porque sempre quis seu melhor, pois não basta ser bom, temos que ser o melhor naquilo que fazemos.

As minhas tias/madrinhas Eliete e Vânia, que sempre foram duas mãezonas na minha vida, participando de cada conquista e vibrando com cada acerto. Sei que vocês sempre acreditaram no meu sucesso!

Aos meus sogros Luciana e Adevaldo, que juntamente com a minha cunhada Juliana, fizeram parte dessa história e me acolheram, se tornando uma família para mim.

A minha amada Lolla, que me tornou uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice diretora Prof. Tit. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós- graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa Adj. Juliana Campos Junqueira e vice coordenadora Profa Dra. Ana Lia Anbinder, pelo apoio constante para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, muito obrigada pelos ensinamentos e pela contribuição na minha formação profissional.

Ao meu orientador, Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Agradeço por ter me guiado nesses 2 anos de mestrado, ensinando não só sobre Microbiologia e Imunologia, mas também sobre a vida de docência que só 40 anos de carreira poderiam ensinar, uma jovem de 26 anos. E acima de tudo professor, obrigado por ter acreditado em mim e acreditado que eu poderia dar certo, não me julgando quando o senhor não me conhecia. Meu respeito ao profissional, que tanto contribui para o programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal ser o que ele é hoje e a nossa amada Microbiologia.

A vice-coordenadora do Programa de Biopatologia Bucal, Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

Agradeço a professora Juliana por todas as dúvidas sanadas com relação ao modelo invertido *Galleria mellonella*. E pela oportunidade de me deixar ser aluna efetiva no programa de pós-graduação, participando de programas de extensão, formulação do site da Biopatologia Bucal e compartilhando comigo sua experiência como coordenadora. Sei que se um dia chegar a coordenação de um curso, seus ensinamentos terão sido de grande valia.

A Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira

Agradeço a professora Luciane, por ter dado todo o apoio e suporte no período de publicação do artigo para defesa. Me acalmando e mostrando que para tudo damos um jeito, arrumamos as correções várias vezes se

necessário e felizmente publicamos nosso artigo, resultado de um crédito na qual ela e a Profa. Juliana ministraram. Obrigado Profa. Luciane, admiro muito a profissional que a senhora é, e agradeço o aceite do convite para banca da defesa. A senhora não poderia faltar nesse dia tão especial...

A Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito e Profa Dra. Flávia Villaça de Moraes

Meu agradecimento as duas professoras, que além de grandes mestres que contribuíram para versão final dessa dissertação, são duas grandes amigas. Agradeço a Profa. Dra. Graziella pelo auxílio no entendimento da biologia molecular, que caracteriza-se como uma ciência difícil para mim, que apenas seu carinho de amiga/professora poderiam fazer com que eu entendesse um pouco. A Profa. Dra. Flávia, minha mestre que desde o primeiro ano de faculdade me incentivou a ser a profissional que me tornei hoje! Esteve comigo desde a iniciação científica à monografia de curso, deixo meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Luíz Eduardo Blumer Rosa

Pela ajuda com o scanner das lâminas de histologia, mostrando solicito desde o primeiro momento.

A Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho e Profa. Adj. Ana Lia Anbinder
Que permitiram o agendamento e uso do scanner de lâminas, bem como o auxílio do Prof. Luiz Eduardo Blumer Rosa.

Ao técnico da Histologia, Walter Cruz

Ao Walter meu eterno carinho, primeiro pela pessoa fantástica que ele é, sempre de bom humor, disposto a ajudar aos alunos de graduação e pós-graduação. Exemplo de funcionário que ama o que faz, tendo prazer em ajudar os alunos na confecção das lâminas e colorações de histologia. Walter obrigado por ter me ensinado as técnicas histológicas.

A Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

Por ter aceitado o convite de participar na banca final da dissertação, na qual tenho a certeza que irá agregar e muito para este trabalho. Sua escolha foi muito bem pensada, devido a admiração que tenho pela senhora, seu trabalho e pela posição na qual a professora como Biomédica alcançou dentro da Universidade de Taubaté.

A doutoranda, Nádia Domingues

Primeiro pela amizade e disposição em me guiar no cultivo dos *Streptococcus*, por ter dado início a esse trabalho no seu mestrado, proporcionando que no meu

possamos entender melhor como esses micro-organismos fantásticos agem em interação.

A pós-doutorada, Cristiane Aparecida Pereira

Por ter me ensinado muito, nesse período de mestrado com um carinho, livre de interesse que só uma mãe poderia dar! Cris, mãezona do mestrado, obrigado por nunca ter me inferiorizado por ter uma titulação abaixo da sua e me tratado por igual, podendo me ensinar e deixando com que eu também ensinasse a você. Que Deus te ilumine e acompanhe sempre!

Ao mestrando, Lucas de Paula

Pela amizade, cumplicidade e apoio nos momentos difíceis, que a pressão dos prazos e a ansiedade nos proporcionou. Amigo biomédico, quero levar sua amizade para sempre e que um dia possamos atuar lado a lado em um curso de Biomedicina.

A mestranda, Livia Mara dos Santos

Livia, você é uma das grandes amizades que levo dessa vida nossa. Obrigado pelo apoio na publicação de dois artigos, no qual tinha você para contar em primeiro lugar. “Um sonho dentro de um sonho...”

A doutoranda, Aline Chiodi Borges

Amiga de longa data, que me ensinou a prática de Microbiologia no início do ingresso à UNESP. Sempre incentivou para que eu buscasse o que fosse melhor para mim em primeiro lugar e apesar dos ocorridos ao longo da jornada, manteve com a amizade leal e única que o tempo não apagou.

" Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus;
eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça."

Isaías 41:10

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivos específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Micro-organismos e condições de crescimento	17
3.2 Preparo de suspensões dos micro-organismos.....	17
3.3 Estudo da formação de biofilme monotípico de <i>C. albicans</i> e heterotípico associados com <i>S. mitis</i> ou <i>S. sanguinis</i>	18
3.3.1 Determinação do número de UFC/mL	20
3.4 Estudo dos efeitos de <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>	20
3.5 Interação entre <i>C. albicans</i> com <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	22
3.5.1 Injeção em <i>Galleria mellonella</i>	23
3.5.2 Determinação das concentrações microbianas	23
3.5.3 Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	24
3.5.4 Estudo da cultura de tecidos - contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> sozinha e em associação com <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i>	25
3.5.5 Análise histológica de <i>G. mellonella</i> nas associações de <i>C. albicans</i> com <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i>	27
3.6 Expressão dos genes de <i>C. albicans</i> após associação com <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i>	29

3.6.1 Avaliação da expressão gênica de <i>C. albicans</i>	31
3.6.2 Extração e quantificação do RNA	31
4.6 Avaliação da expressão gênica	32
4.6.1 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)	32
4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
4.7 Análise estatística	33
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Biofilme: contagem de UFC/mL	35
5.2 Filamentação de <i>C. albicans</i> (<i>in vitro</i>)	36
5.3 Expressão gênica	37
5.3.1 Avaliação da quantidade de transcritos (RNA _m).....	38
5.3.2 Genes de aderência.....	39
5.3.3 Genes de biofilme	41
5.4 Interação de <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i> com <i>C. albicans</i> em modelo experimental de <i>G. mellonella</i>	43
5.4.1 Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	43
5.4.2 Contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i> sozinha e em associação com <i>S.</i> <i>mitis</i> e <i>S. sanguinis</i> em hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	46
5.4.3 Análise da filamentação <i>in vivo</i> em <i>G. mellonella</i>	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

Palma ALR. Análise de fatores de virulência de *Candida albicans* na associação com *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* *in vitro* e *in vivo* [dissertação] São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

O objetivo foi avaliar as interações entre *Candida albicans* (ATCC 18804) com *Streptococcus mitis* (49456) e *Streptococcus sanguinis* (10556) *in vitro* e *in vivo* avaliando-se a possível influência destas associações, na expressão de genes, na filamentação e formação de biofilme de *Candida albicans*. A formação de biofilme, foi realizado mono e multiespécie em placa de 96 poços por 48 h à 37 °C com 5% CO₂. Os biofilmes foram desagregados e diluídos para semeadura em ágar e após incubação as UFC/mL foram contadas. A filamentação de *C. albicans*, *in vitro* foi realizada em placas de 24 poços e *in vivo* em *Galleria mellonella*, com análise histológica e contagem de UFC/mL. A avaliação da expressão gênica de *ALS1*, *ALS3*, *BRC1*, *CPH1*, *EFG1* e *HWP1*, foi realizada por PCR em tempo real utilizando o gene normalizador *ACT1*. Os resultados da UFC/mL ($p < 0.05$), demonstrou que o biofilme de *C. albicans* monoespécie apresentou maior crescimento, quando comparado com o biofilme associado com *S. mitis* ($p = 0,001$) ou com *S. sanguinis* ($p = 0,001$). A filamentação *in vitro* demonstrou que a interação com *S. mitis* inibiu a filamentação de *C. albicans* ($p = 0,0006$), entretanto, a interação com *S. sanguinis* não inibiu ($p = 0,1554$). Os genes *ALS1*, *ALS3* e *HWP1* foram super expressos na interação com *S. mitis*. A interação com *S. sanguinis*, promoveu super expressão dos genes *ALS3* e *HWP1*. Os genes *BRC1*, *CPH1* e *EFG1* foram super expressos na interação com *S. mitis* e sub expressos, na interação com *S. sanguinis*. Não houve diferença estatística nos estudos *in vivo* de filamentação e UFC/mL. Conclui-se que *in vitro*, *S. mitis* e *S. sanguinis* foram capazes de inibir a formação de biofilme de *C. albicans*. Assim como a interação com *S. mitis* inibiu a sua filamentação. A interação com *S. mitis* parece aumentar o fator de virulência de *C. albicans*, quanto a expressão dos genes de aderência *ALS1*, *ALS3* e *HWP1*, bem como na associação com *S. sanguinis* (*ALS3* e *HWP1*). Os genes de formação de biofilme, *BRC1*, *CPH1* e *EFG1*, na interação com *S. mitis* promoveu aumento do fator de virulência.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Streptococcus mitis*. *Streptococcus sanguinis*. Fatores de Virulência. *Galleria mellonella*.

Palma ALR. Analysis of virulence factors of Candida albicans in association with Streptococcus mitis and Streptococcus sanguinis in vitro and in vivo [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the interactions between Candida albicans (ATCC 18804) with Streptococcus mitis (49456) and Streptococcus sanguinis (10556) in vitro and in vivo evaluating the possible influence of these associations, in the expression of genes, in the filamentation and biofilm formation of Candida albicans. Biofilm formation was performed mono- and multispecies in 96-well plate for 48 h at 37 °C with 5% CO₂. Biofilms sonicated and diluted for sowing on agar and after incubation the colonies counted to obtain the colony forming units (CFU/mL). The filamentation in vitro was performed in 24-well plate and in vivo Galleria mellonella, with histological and CFU/mL. The evaluation of gene expression ALS1, ALS3, BRC1, CPH1, EFG1 and HWP1 was performed by real-time PCR using the normalizing gene ACT1. The results of CFU/ml ($p < 0.05$), found that C. albicans biofilm monoespécie showed increased growth, as compared to the biofilm associated with S. mitis ($p = 0.001$) and S. sanguinis ($p = 0.001$). The filamentation in vitro demonstrated that the interaction with S. mitis inhibited C. albicans filamentation ($p = 0.0006$), interaction with S. sanguinis could not ($p = 0.1554$). The ALS1, ALS3, HWP1 gene, were superexpressed in S. mitis interaction. Interaction with S. sanguinis, promoted overexpression of ALS3 and HWP1 genes. The BRC1 genes, CPH1 and EFG1 were super expressed in interaction with S. mitis and sub expressed when there was interaction with S. sanguinis. There was no statistical difference in the in vivo studies of filamentation and CFU/mL. It follows that in vitro, S. mitis and S. sanguinis were able to inhibit the formation of C. albicans biofilms. Like the interaction with S. mitis inhibited its filamentation. The interaction with S. mitis appears to increase the virulence factors of C. albicans. ALS1, ALS3, HWP1 as the expression of adhesion genes, and as well as in association with S. sanguinis (ALS3 and HWP1). Biofilm formation genes, BRC1, CPH1 and EFG1 in interaction with S. mitis promoted increased virulence factor.

Keywords: Candida albicans. Streptococcus mitis. Streptococcus sanguinis. Virulence factors. Galleria mellonella.

1 INTRODUÇÃO

Biofilme caracteriza-se por uma comunidade microbiana organizada, aderida a uma superfície, embebida em uma matriz polimérica extracelular (Cieplick et al., 2014; Katharios-Lanwermyer et al., 2014; Wu et al., 2014). A descoberta do biofilme, revolucionou a ciência e sua visão a respeito das doenças. Os biofilmes correspondem ao modo dominante de existência microbiana na natureza (Costerton et al., 1995).

As espécies de micro-organismos que formam biofilmes atuam por meio de uma espécie de “mosaico celular”, que promovem interações célula-célula, aumentam a persistência de espécies individuais e em grupo, realizam sinalização celular, e conferem também resistência a antibióticos e proteção contra o sistema imune do hospedeiro (Costa et al., 2013; Mancl et al., 2013; Katharios-Lanwermyer et al., 2014; Del Pozo, Cantón, 2016).

Em biofilme, pode ocorrer a competição entre os micro-organismos podendo ocorrer pelo meio ou prevalência de uma das espécies em particular (Thein et al., 2009; Yang et al., 2016).

Estudos realizados com modelos murinos (Xu et al., 2014a) e *in vitro* (Diaz et al., 2012) utilizando modelos de mucosas orais e esofágicas, respectivamente, relataram que quando *C. albicans* e *Streptococcus* do grupo *mitis* estão em biofilme, acabam adquirindo potencial patogênico, sendo que, a capacidade de invasão dos tecidos da mucosa por *Candida* é aumentado.

A associação de *C. albicans* com outras espécies de estreptococos como *Streptococcus sanguinis* por exemplo, confere vantagens ao fungo principalmente com relação a sua adesão, na qual não precisaria competir efetivamente para se fixar no biofilme, já que a levedura podera se aderir a colonizadores pioneiros ali já encontrados (O’Sullivan et al., 2000; Xu et al.

2014b). Outra vantagem está relacionada ao aproveitamento pelas leveduras do lactato proveniente do metabolismo dos estreptococos, utilizando o metabólito descartado como fonte de carbono (Jenkinson et al., 1990).

Os estreptococos do grupo *mitis*, são membros permanentes da microbiota residente respiratória e oral. Destaca-se as espécies *S. sanguinis* e *S. mitis*, sendo o último um colonizador precoce do biofilme, podendo permitir que posteriormente colonizadores secundários possam se aderir e desencadear a formação de biofilme heterotípico (Rukke et al., 2012; Di Giulio et al., 2013; Nobbs et al., 2014). Apesar de serem micro-organismo residentes, em determinadas situações após uma extração dentária, ocorre bacteriemia em cerca de 30% dos pacientes. Pode ocorrer bacteriemia por estreptococos do grupo *mitis*, inclusive por *S. sanguinis* e *S. mitis*, e estes micro-organismos podem se instalar em valvas cardíacas e produzir endocardite bacteriana subaguda ou alterações congênitas em pacientes de alto e médio risco (Mitchell, 2011; Jakubovics et al., 2014).

Dentre os fungos de interesse médico, as leveduras do gênero *Candida*, apresentam importância devido à alta prevalência em infecções humanas. São encontradas em 20-80% do trato intestinal de adultos saudáveis e 20-30% da região geniturinária em mulheres (Colombo et al., 2013; Serrano-Fujarte et al., 2015; Gulati, Nobile, 2016). Dentre suas espécies, *Candida albicans* está presente como comensal em aproximadamente 70% da população saudável, habitando cavidade oral, genital e trato gastrointestinal, porém, se o indivíduo se encontra imunocomprometido ou em longo tratamento com antibióticos, o fungo pode se tornar um oportunista e causar doença (Han et al., 2011; Hsu et al., 2013; Nobile, Johnson, 2015).

A expressão dos genes de *C. albicans* tem sido amplamente estudada, principalmente aquelas que atuam na formação de biofilme. Segundo Stichernoth, Ernest (2009), aproximadamente 25 proteínas produzidas por *C.*

albicans tem demonstrado valor significativo, quando se trata do desenvolvimento do biofilme. Duas classes de proteínas são importantes, proteínas de superfície e fatores de transcrição.

Os genes *ALS1* e *ALS3* (*Agglutinin Like Sequence*) estão envolvidos nos aspectos da interação patógeno-hospedeiro, pois produzem fatores que atuam na adesão e na invasão das células do hospedeiro (Hoyer, 2001; Nailis et al., 2006; García-Sánchez et al., 2004; Murciano, 2012; Sheppard et al., 2014). O gene *HWP1* (*Hyphal wall protein*) é responsável por codificar uma proteína de superfície encontrada na parede celular das hifas, e o gene *ALS1* apresenta importância na aderência em células endoteliais e epiteliais humanas (Marchais et al., 2005; Karkowska-Kuleta, 2009; Hnisz et al., 2012). O dimorfismo de *C. albicans* (Jacobsen et al., 2012; Moazeni et al., 2014) é encontrado pela atividade do gene *EFG1* (*Enhanced filamentous growth*), um importante fator regulador dessa transição morfológica (Lassak et al., 2011; Hnisz et al., 2012; Pierce, Kumamoto, 2012; Connolly et al., 2013).

A mudança fenotípica de *C. albicans*, conhecido como fenômeno *switching*, na qual está relacionado com a capacidade da mudança das células leveduriformes em “brancas” para “opacas” representam importante fator de virulência (Ramirez-Zavala et al., 2013). Essa resposta é mediada por uma proteína, acoplada a uma cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) na qual culmina com o fator de transcrição do gene *CPH1* (*Candida pseudo hyphal regulator*) (Liu et al., 1994; Ramirez-Zavala et al., 2013).

O gene *BCR1* é um fator de transcrição que atua no biofilme, pois regula a sua informação, bem como a formação da matriz extracelular. A deleção desse gene, pode resultar em biofilme defeituoso, com pouca matriz extracelular e mais permeável a moléculas, tornando-o assim menos atrativo para adesão de micro-organismos. Sua importância também está ligada na

regulação de outros genes de aderência, como o *ALS3* por exemplo (Fanning et al., 2012; Srikantha et al., 2013).

Modelos de invertebrados como de *Galleria mellonella*, tem sido útil no estudo dos fatores de virulência de *C. albicans* (Arvanitis et al., 2013; Sherry et al., 2014; Scorzoni et al., 2013; Zdybicka-Barabas et al., 2015). O modelo apresenta várias vantagens quando comparados com modelos animais como camundongos e ratos (Perdoni et al., 2014; Lopez-Hernández et al., 2015).

G. mellonella possui um sistema de defesa celular e humoral, no qual existe a produção de peptídeos antimicrobianos (semelhante a resposta imune inata dos mamíferos) e a produção de seis tipos de hemócitos presente na hemolinfa (prohemócitos, coagulócitos, esferulócitos, enocitóides, plasmócitos e granulócitos), sendo que a ação antimicrobiana destas células é realizada por fagocitose (Arvanitis et al., 2013; Yang et al., 2014; Perdoni et al., 2014; Pereira et al., 2015).

Devido ao prejuízo causado por esses micro-organismos, quando encontrados sob a forma de biofilme, o presente estudo objetivou analisar a interação entre *C. albicans* e *S. mitis* e entre *C. albicans* e *S. sanguinis* a fim de observar a influência destas bactérias na a filamentação *in vitro* e *in vivo* e na expressão dos genes de formação de biofilme e aderência de *C. albicans*. Este conhecimento poderia no futuro contribuir para maior entendimento de como esses micro-organismos pioneiros na formação de biofilme interagem entre si, no intuito de desenvolver terapias mais eficazes para o controle do biofilme.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as interações entre *Candida albicans* com *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* *in vitro* e *in vivo*, avaliando-se a possível influência destas associações na expressão de genes, na filamentação e formação de biofilme por *Candida albicans*.

2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a interação *in vitro* entre *S. mitis* e *S. sanguinis* com *C. albicans* na formação de biofilme por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e na filamentação de *C. albicans*;
- b) Analisar a expressão dos genes *ALS1*, *ALS3*, *HWP1*, *BCR1*, *CPH1* e *EFG1* de *C. albicans*, quando associada em biofilme com *S. mitis* e *S. sanguinis*;
- c) Verificar os efeitos *in vivo* de *S. mitis* e *S. sanguinis* sobre a candidose experimental em *G. mellonella*, avaliando-se quantificação de UFC/mL de *C. albicans* e filamentação por contagem de hifas/leveduras em corte histológico do corpo gorduroso de *G. mellonella*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos e condições de crescimento

Foram utilizadas cepas padrão de *C. albicans* (American Type Culture Collection – ATCC 18804), *S. sanguinis* (ATCC 10556) e *S. mitis* (ATCC 49456) que se encontravam congeladas em freezer -80 °C (NuAire, Plymouth, USA) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia/UNESP.

C. albicans foi semeada em ágar Sabouraud dextrose (BD, Sparks, USA) e incubada em estufa bacteriológica à 37 °C por 24 h. As cepas de *S. sanguinis* e *S. mitis* foram repicadas em ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, USA), acrescido de 15 % de sacarose (Difco, Detroit, USA) e incubadas pelo mesmo período, porém em condições de microaerofilia (5% de CO₂).

3.2 Preparo de suspensões dos micro-organismos

Após a reativação das cepas, foram preparadas suspensões padronizadas dos micro-organismos. Para garantir que não houve contaminação de outros micro-organismos, foram realizados esfregaços em lâminas de microscopia, coradas pela coloração de Gram e foi realizado o teste da catalase para os estreptococos.

Em seguida, as células microbianas foram centrifugadas por 10 min a 2.000 xg (MPW 350, Byosystems, Curitiba, Brasil), o sobrenadante desprezado

e o sedimento suspenso em 10 mL de solução de NaCl 0,85%. O procedimento foi repetido novamente.

Por espectrofotometria (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) foi realizada a quantificação do número de células da suspensão, obtendo-se a concentração referente a 10^7 micro-organismos/mL. Os parâmetros utilizados estão expressos no Quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros utilizados no Espectrofotômetro para padronização da quantidade de micro-organismos nas suspensões (10^7 micro-organismos/mL)

Micro-organismo	Densidade Óptica	Comprimento de Onda
<i>C. albicans</i>	0,381	530 nm
<i>S. mitis</i>	0,560	398 nm
<i>S. sanguinis</i>	0,560	398 nm

nm: Nanômetro

3.3 Estudo da formação de biofilme monotípico de *C. albicans* e heterotípico associados com *S. mitis* ou *S. sanguinis*

A formação de biofilme foi realizada, segundo a metodologia relatada por Thein et al. (2006) com modificações. Os biofilmes foram formados no fundo de placa de microtitulação de 96 poços (TPP, Trasadigen, Suíça), utilizando-se $n = 10$ para cada experimento.

Inicialmente foram inoculados 100 μ L da suspensão de *C. albicans* (10^7 céls/mL) padronizada em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (BD, Sparks, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM e mais 100 μ L do mesmo caldo puro.

Posteriormente a placa foi incubada sob agitação com rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) à 37 °C por 90 min, para promover a adesão inicial de *C. albicans*.

Após a adesão inicial, a suspensão de 200 µL foi aspirada e cada poço foi lavado 2 vezes com solução de NaCl 0,85% para remover as células que não estavam aderidas. Um total de 100 µL de soro fetal bovino (Gibco – New York, EUA) foi transferido para cada poço e a placa incubada por mais 2 h sob agitação.

Para os testes de associação de *Candida* com estreptococos, após os procedimentos mencionados acima, os poços foram novamente lavados 2 vezes com solução de NaCl 0,85%. Para os biofilmes associados (*C. albicans* + *S. mitis* e *C. albicans* + *S. sanguinis*), em cada poço da placa de 96 poços, foram inoculados 50 µL da suspensão padronizada de *S. mitis* ou *S. sanguinis*, de acordo com o item 3.2. No grupo controle, onde *C. albicans* estava sozinha, foram pipetados 50 µL de solução de NaCl 0,85%, em cada poço. A seguir, para a promoção do crescimento do biofilme, 120 µL de YNB (BD, Sparks, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM e 60 µL de caldo *Tryptic Soy Broth* (BD, Sparks, USA) foram adicionados a cada poço.

As placas foram incubadas à 37 °C em estufa sob condições de microaerofilia (5% de CO₂), por 48 h. O caldo foi trocado, por meio de cultura novo após 24 h.

3.3.1 Determinação do número de UFC/mL

Após 48 h, cada poço contendo biofilme foi lavado duas vezes com solução de NaCl 0,85%. A seguir, o biofilme de cada poço, que estava aderido no fundo da placa foi disperso com o homogeneizador ultra-sônico (Sonics Vibra Cell, Connecticut, USA) com potência de 50 W, por 30 s.

A partir da solução obtida foram realizadas diluições decimais das suspensões dos biofilmes, as quais foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose com 50 mg/L de cloranfenicol (União Química, São Paulo, Brasil) para todos os grupos (a- *C. albicans*; b- *C. albicans* associado com *S. mitis*; c- *C. albicans* associado com *S. sanguinis*).

As placas foram incubadas à 37 °C em estufa bacteriológica, por 48 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e o número obtido transformado em logaritmo de base 10 (log₁₀) para cálculo estatístico.

3.4 Estudo dos efeitos de *S. mitis* e *S. sanguinis* sobre a filamentação de *C. albicans*

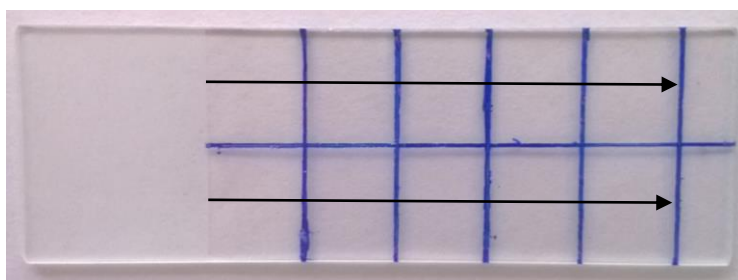
Para estudo da filamentação *in vitro*, foram também avaliados os três grupos experimentais; a) *C. albicans*; b) *C. albicans* associado com *S. mitis* e c) *C. albicans* associado com *S. sanguinis*.

Os micro-organismos foram padronizados a 10⁷ células/mL, sendo *C. albicans* em caldo YNB suplementado com glicose na concentração de 100 mM e os estreptococos em caldo TSB.

Em placa de cultura de células de 24 poços (TPP, Trasadigen, Suíça) foi adicionado 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100 μ L de suspensão padronizada de *C. albicans* (n=5). A seguir, em cada poço foi pipetado 100 μ L de suspensão padronizada de *S. mitis* ou *S. sanguinis*. No grupo controle (a- *C. albicans*) foi adicionado em cada poço 100 μ L de solução de NaCl 0,85%.

A placa contendo os inóculos foi incubada à 37 °C por 24 h. A seguir, 50 μ L do inóculo contido em cada poço foi depositado sobre lâminas microscópicas com 10 campos, demarcados anteriormente no verso (Figura 1).

Figura 1 – Lâmina de microscopia utilizada para análise da filamentação de *C. albicans*, com demarcação dos campos para contagem de hifas presentes



Legenda: a seta preta corresponde onde foi feito o arraste para a leitura dos campos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula, sendo observado em microscópio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Alemanha) na objetiva de 40x. Foram realizados 5 ensaios para cada grupo experimental, em duplicata, em momentos diferentes. Foram contados 10 campos microscópios em cada lâmina e atribuídos scores de acordo com número de hifas presentes, conforme o Quadro 2.

Quadro 2 – Escores utilizados na verificação da filamentação de *C. albicans* obtidos na contagem do número de hifas presentes em cada campo observado

Escore	Quantidade de hifas
0	ausente
1	1 à 20
2	21 à 40
3	41 à 50
4	Mais de 50

3.5 Interação entre *C. albicans* com *S. mitis* e *S. sanguinis* em modelo experimental de *G. mellonella*

Os efeitos da interação de *C. albicans* com *S. mitis* e *S. sanguinis* em *G. mellonella*, foram baseadas nas metodologias descritas por Mylonakis et al. (2005) e Fuchs et al. (2010). Foram utilizadas lagartas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 260 à 300 mg, obtidas por meio do criadouro do laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências e Tecnologia – ICT, UNESP/São José dos Campos. As lagartas foram mantidas sem alimentação durante o período que ocorreu o experimento.

3.5.1 Inoculação em *G. mellonella*

As lagartas foram inoculadas com seringa de Hamilton (701N 10 μ SYR (26s/2”/2) - Hamilton Company, Nevada, EUA). Antes da inoculação, a seringa foi desinfetada com hipoclorito de sódio (Asfer, São Caetano do Sul, Brasil) durante 30 min e 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 que continham respectivamente: a) 20 mL de hipoclorito de sódio 25%; b) 20 mL de álcool absoluto; c) 20 mL de água destilada estéril; d) 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.

3.5.2 Determinação das concentrações microbianas

Foram realizadas suspensões padronizadas de *S. mitis* e *S. sanguinis* em diferentes concentrações (10^4 a 10^7 UFC/larva) e para *C. albicans* (10^7 e 10^6 UFC/larva). Estas suspensões foram preparadas de acordo com o item 3.2 padronizadas em espectrofotômetro para os estreptococos, enquanto para *C. albicans* a suspensão foi padronizada em câmara de Neubauer (Laboroptik, Lancing, UK).

3.5.3 Curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Após a padronização das concentrações do item 3.5.2, foram injetados 10 µL de inóculo na última proleg de cada lagarta (Figura 2), de acordo com os grupos: a) *C. albicans*; b) *C. albicans* em associação com *S. mitis* e c) *C. albicans* associação com *S. sanguinis*. Os inócuos de *Candida* foram injetados na proleg direita de todos os grupos e os estreptococos na proleg esquerda, de cada grupo correspondente.

Um grupo controle adicional, foi realizado, no qual foi injetado 10 µL de solução de NaCl 0,85% na proleg esquerda e igual volume na proleg direita.

Após a inoculação, as lagartas foram colocadas em placas de Petri (J Prolab, Pinhais, Brasil) e mantidas em estufa a 37 °C. As lagartas foram observadas, 18 h após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente a cada 24 h, sendo o número de lagartas mortas anotadas.

O experimento foi conduzido por 7 dias, ou até todas as lagartas do grupo consideradas mortas, quando não apresentaram nenhum movimento ao toque ou entraram no estágio de pupa.

Os resultados foram analisados, para escolha da melhor concentração tanto de *C. albicans*, quanto de *S. mitis* e *S. sanguinis*, de acordo com o objetivo do presente trabalho.

Figura 2 – Inoculação em *G. mellonella* com seringa de Hamilton na última proleg direita



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.4 Contagem de UFC/mL de *C. albicans* sozinha e em associação com *S. mitis* e *S. sanguinis* em hemolinfa de *G. mellonella*

A quantificação da presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella*. Foi realizada por meio da eutanásia das lagartas nos tempos de 0, 6 e 12 h após a infecção, nos mesmo grupos experimentais do item 3.5.3.

Foi utilizada um pool de 4 lagartas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. O experimento foi realizado em duplicata, para cada grupo e tempo foram utilizadas 12 lagartas, totalizando 36 lagartas infectadas por ensaio.

Em cada tempo, as lagartas foram cortadas com auxílio de um bisturi estéril nº 15 (Med Goldman, Manaus, Brasil) entre as duas últimas proleg

e espremidas para retirada da hemolinfa, que foram acondicionadas em um tubo de microcentrífuga (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha) (Figura 3).

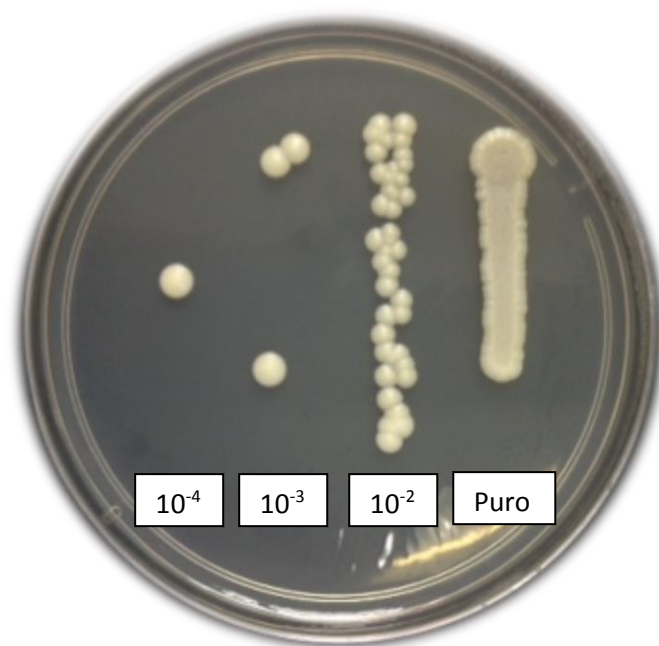
Figura 3 – A lagarta posicionada para retirada da hemolinfa, acondicionada em tubo de microcentrífuga



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir do pool da hemolinfa das lagartas, foram realizadas diluições seriadas (puro – 10^{-2} – 10^{-3} – 10^{-4}), pipetado 10 μL de cada diluição e semeadas pela técnica da gota escorrida (Figura 4) em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (BD, Sparks, USA) com cloronfenicol. As placas foram incubadas à 37 °C por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

Figura 4- Contagem da UFC/mL pela técnica da gota em placa de ágar Sabouraud



Legenda: foi utilizada para contagem nesta placa a diluição 10^{-2} .
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.5 Análise histológica de *G. mellonella* nas associações de *C. albicans* com *S. mitis* e *S. sanguinis*

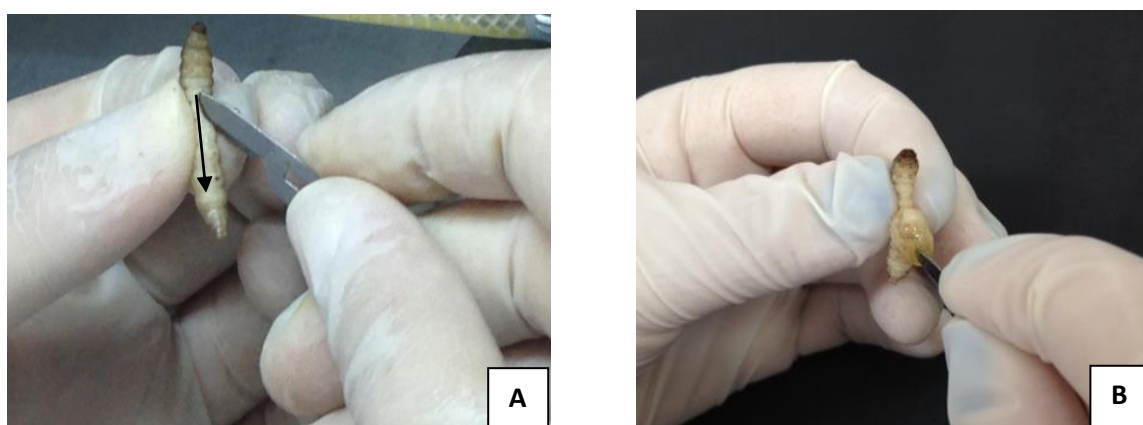
A análise histológica foi baseada na metodologia descritas por Vilela et al. (2015). Foram realizados os mesmos grupos experimentais e o mesmo tempo de infecção do item 3.5.2. Após os períodos de infecção, foi realizado uma incisão na linha mediana da parte ventral do animal. A partir desta incisão o corpo de gordura foi removido (Figura 5). Foram utilizadas 5 lagartas para coleta do corpo gorduroso.

O experimento foi realizado em duplicata, para cada grupo e tempo foram utilizadas 15 lagartas, totalizando 45 lagartas infectadas por ensaio.

O corpo de gordura foi colocado em formalina à 10% e armazenado à 4 °C para fixação pelo período de 24 h. A seguir, o tecido foi colocado em etanol à 50, 70 e 90% por 1 h para cada uma das concentrações e 100% durante 3 h para promover a desidratação (Leica TP1020, Leica Byosystems, Wetzlar, Germany)

O tecido foi transferido para uma solução de xilol durante 3 h e foram montados em blocos de parafina.

Figura 5 – Sequência da retirada do corpo de gordura da lagarta *G. mellonella*



Legenda: A) corte mediano realizado na parte ventral da lagarta (seta); B) pressão lateral realizada na lagarta para remoção do corpo de gordura
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica RM2255, Leica Byosystems, Wetzlar, Germany) e corados com hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS). As lâminas contendo os cortes inteiros foram scaneados (Panoramic desk, 3D Histech, Budapest, Hungria)

Para análise da filamentação, foram fotografadas todas as áreas do corte histológico que apresentaram hifas e leveduras em um aumento original de 200X, por meio do *software* (Panoramic viewer, 3D Histech, Budapest,

Hungria) pertencente ao aparelho. Em cada imagem foi determinada a área ocupada por hifas e leveduras em μm , com o auxílio do programa Image-J (Versão 1,32 para Windows), de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA. As áreas de hifas e leveduras de cada corte foram somadas e o resultado convertido para logaritmo de base 10.

3.6 Expressão de genes de *C. albicans* após associação com *S. mitis* e *S. sanguinis*

Para a formação dos biofilmes heterotípicos foi utilizado a metodologia descrita no item 3.3. Os biofilmes foram preparados com as associações microbianas de *C. albicans* ATCC 18804 com as diferentes suspensões de *S. mitis* ATCC 49456 e *S. sanguinis* ATCC 10556. Para controle positivo do experimento foi obtido biofilme monotípico de *C. albicans* no intervalo de tempo de 48 h.

3.6.1 Avaliação da expressão gênica de *C. albicans*

As amostras provenientes do biofilme heterotípico descrito anteriormente foram submetidas avaliação da expressão, dos seguintes genes: *ALS1*, *ALS3*, *HWP1*, *CPH1*, *BCR1* e *EFG1*. Foram avaliados como genes normalizadores *ACT1*, *RIP1*, *LSC2* e *PMA1* e foi selecionado para os demais experimentos o gene *ACT1* (Quadro 3).

Quadro 3 – Genes de *C. albicans*, cuja expressão gênica foi avaliada após a interação com *S. mitis* e *S. sanguinis*

(continua)

Gene	Localização	Função	Referência	Link NCBI
<i>HWP1</i>	orf19.1321	Proteína da parede celular	Hnisz et al. (2012)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U64206.1
<i>ALS1</i>	orf19.5741	Adesina – aderência à célula hospedeira	Nailis et al. (2010)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L25902.1
<i>ALS3</i>	orf19.1816	Adesina – aderência à célula hospedeira	Nailis et al. (2010)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U87956.1
<i>BCR1</i>	orf 19.723	Regula a formação de biofilme e parede celular	Hnisz et al. (2012)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP017630.1
<i>CPH1</i>	orf19.4433	Principal regulador transcricional envolvido em acasalamento	Liu et al. (1994)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U15152.1
<i>EFG1</i>	orf19.610	Principal regulador transcricional envolvido na morfogênese	Hnisz et al. (2012)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_709104.1
**ACT1	orf19.5007	Integridade estrutural citoesqueleto	Nailis et al. (2006)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/109776
*RIP1	orf19.5893	Enzima, ubiquinol-citocromo c redutase	Nailis et al. (2006)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/856689

Quadro 3 – Genes de *C. albicans*, cuja expressão gênica foi avaliada após a interação com *S. mitis* e *S. sanguinis*

(continuação)

Gene	Localização	Função	Referência	Link NCBI
* <i>LSC2</i>	orf19.1860	Ligação de ATP, atividade succinato-CoA-ligase	Nailis et al. (2010)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/853159
* <i>PMA1</i>	orf 19.5383	ATPase da membrana plasmática	Nailis et al. (2006)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/852876

* Genes normalizadores testados

** Gene normalizador que foi selecionado

3.6.2 Extração e quantificação do RNA

A extração do RNA foi realizada com o auxílio do reagente Trizol (Ambion®, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Este reagente é composto por uma solução monofásica contendo fenol, isotiocianato de guanidina e outros componentes que permitirão o isolamento de RNA. Após extração, a concentração de RNA foi quantificada pelo aparelho Nanodrop 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), e os produtos obtidos armazenados em freezer a -70 °C.

4.6 Avaliação da expressão gênica

4.6.1 Reação de transcrição reversa (RT – PCR)

O RNA total após o tratamento com DNase foi transcrito para cDNA utilizando o Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (INVITROGEN), onde 1 a 2 µg de RNA foi adicionado a um microtubo de 200 µL contendo 10 µL de mix RT, 2 µL de enzima mix e água ultra pura Depec obtendo-se volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada em termociclador (Mastercycler-Eppendorf) com ciclo de: 20 min à 25 °C, 50 °C por 30 min e 85 °C por 5 min. A seguir, os tubos foram acondicionados no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubados por mais 30 min à 37 °C. O cDNA obtido foi armazenado à -20 °C.

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Os produtos da RT- PCR foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes escolhidos. As reações de quantificação foram realizadas de acordo com as condições e parâmetros previamente descritos para cada um dos genes alvo. A expressão genética foi apresentada como o ratio da concentração dos genes alvo, em relação à concentração do gene normalizador (*ACT1*, *RIP1*, *LSC2* ou *PMA1*) e representam a expressão média obtida de reações distintas de PCR em Tempo Real. Neste trabalho foram testados quatro genes normalizadores, sendo que, o gene normalizador escolhido apresentou Ct

(*cycle threshold* - ou limiar) similar aos genes alvos analisados. O Ct é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em triplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo com normalização a um controle interno. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resultou em valor 1.

O método qRT-PCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG - Invitrogen) realizando-se a seguinte reação: em um microtubo de 200 µL, foi colocado 12,5 µL de Supermix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 10 µM de primer forward, 10 µM de primer reverse, solução de cDNA alvo e água Depec para o volume final de 25 µL. Os microtubos foram incubados em termociclador (StepOnePlus, Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50 °C por 2 min, seguido de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min e mais 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no Software do próprio equipamento de real-time.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., California, USA).

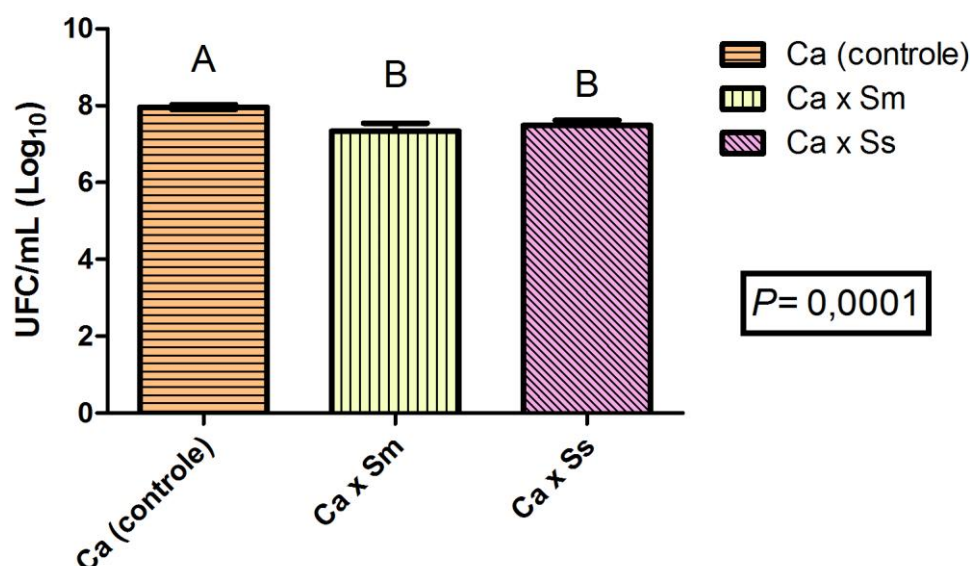
O teste de *Tukey* (duas ou mais variáveis) foi utilizado para contagem de UFC/mL obtida da formação de biofilme *in vitro*, assim como para contagem de UFC/mL obtida da interação *in vivo*. O teste de *Mann Whitney* foi utilizado para análise da filamentação *in vitro*. Com relação a quantificação de transcritos dos genes alvo, foi utilizado o teste One-way ANOVA. Para avaliação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). A análise da filamentação *in vivo* foi realizada com o teste One-way ANOVA. Diferença estatisticamente significativa foi considerada quando o valor de *p* foi menor que 0.05.

5 RESULTADO

5.1 Biofilme: contagem de UFC/mL

Na Figura 6 está representada a comparação da contagem de UFC/mL (log10) entre os biofilmes isolados de *C. albicans* e a associação de *C. albicans* com *S. mitis* e *C. albicans* com *S. sanguinis*. Observa-se nesta figura que o biofilme de *C. albicans* monoespécie apresentou maior crescimento, com diferença estatística, quando comparado com o biofilme associado com *S. mitis* ($p = 0,0001$) e biofilme de *C. albicans* com *S. sanguinis* ($p = 0,0001$). Porém, quando comparados apenas os biofilmes associados, os mesmos não apresentaram diferença estatística significativa ($p = 0,1065$). Os estreptococos influenciaram na redução dos biofilmes formados por *C. albicans*, em comparação aos biofilmes isolados desta levedura, em 79,37% quando da associação com *S. mitis*, e 71,44% na associação com *S. sanguinis*.

Figura 6 - Médias e desvios padrão dos dados de UFC/mL de *C. albicans* (Log₁₀) obtidos na formação de biofilmes isolados de *C. albicans* e em associação com *S. mitis* (Ca x Sm) e *C. albicans* com *S. sanguinis* (Ca x Ss), com n = 10

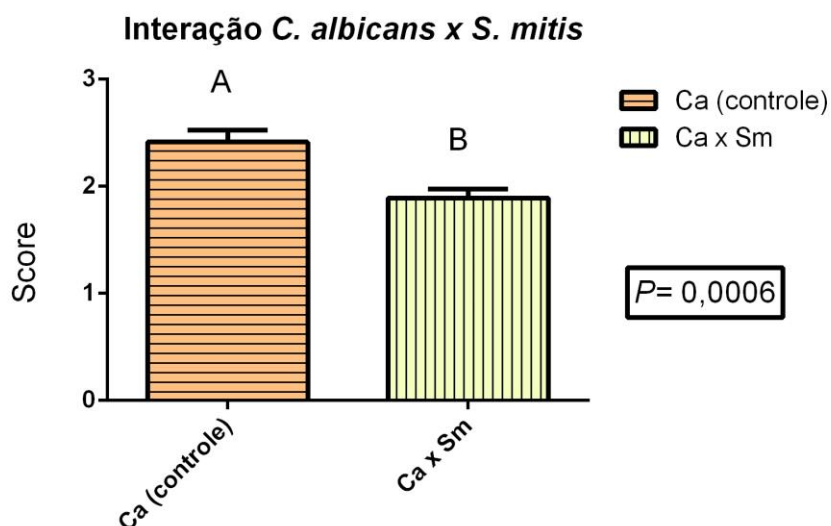


Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).
 Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

5.2 Filamentação de *C. albicans* (in vitro)

Os dados obtidos com o ensaio da filamentação de *C. albicans* demonstraram que a interação com *S. mitis* foi capaz de inibir a filamentação de *C. albicans* ($p = 0,0006$), apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 7). Entretanto, *S. sanguinis* não foi capaz de inibir a filamentação de *C. albicans* quando da associação de ambos ($p = 0,1554$) (Figura 8).

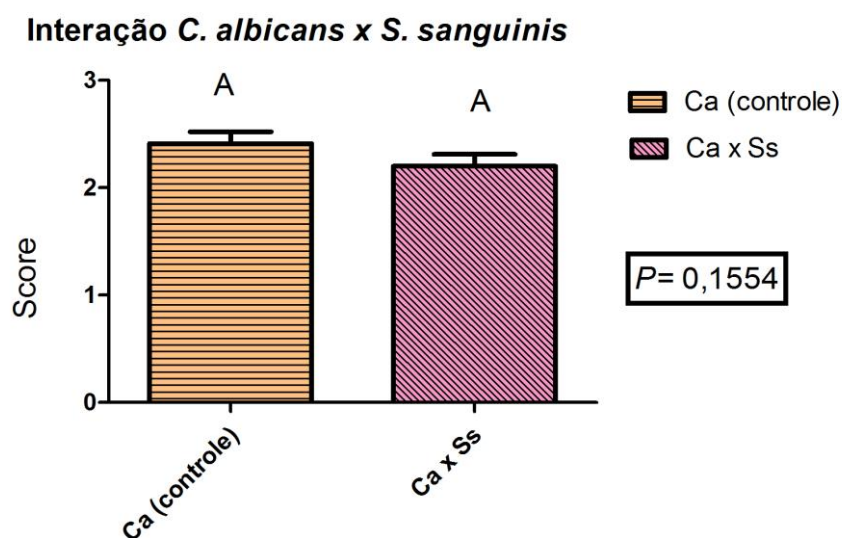
Figura 7 - Análise da filamentação de *C. albicans* após 24 h da interação de *C. albicans* com *S.mitis*, com n = 05



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (teste de *Mann Whitney*, $p < 0,05$)

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

Figura 8 - Análise da filamentação de *C. albicans* após 24 h da interação de *C. albicans* com *S. sanguinis*, com n = 05



Legenda: letras iguais indicam que não houve diferença estatística significativa (teste de *Mann Whitney*, $p < 0,05$).

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

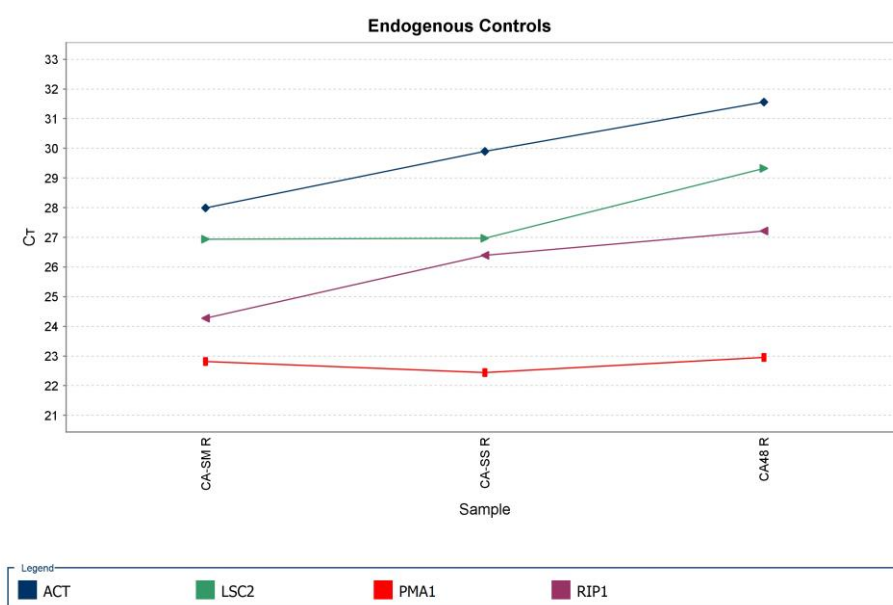
5.3 Expressão Gênica

5.3.1 Avaliação da quantidade de transcritos (R_{na_m})

A eficiência dos *primers* utilizados no trabalho foi em torno de 95 a 100% para cada primer testado, a validação e padronização do *primer* foi realizada pelo teste de q(PCR). A curva de *Melting* realizada, confirmou a presença de um único pico, o que demonstrou a especificidade do *primer* testado. Posteriormente foi analisado o gene normalizador que apresentou menor variação em relação as amostras testadas.

Os genes normalizadores, *ACT1*, *LSC2*, *PMA1* e *RIP1* foram analisados no *software* (*Expression Suite*: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/software-downloads/expressionsuite-software.html>) e o gene normalizador *ACT1* foi selecionado, uma vez que apresentou menor variação dos Ct entre os grupos avaliados (Ca, Ca Sm e Ca Ss) (Figura 9).

Figura 9 – Análise dos genes normalizadores *ACT1*, *LSC2*, *PMA1* e *RIP1* em relação as amostras *C. albicans* e *S. mitis* (CA-SMR), *C. albicans* e *S. sanguinis* (CA-SSR) e biofilme monotípico de *C. albicans* (CA48R)

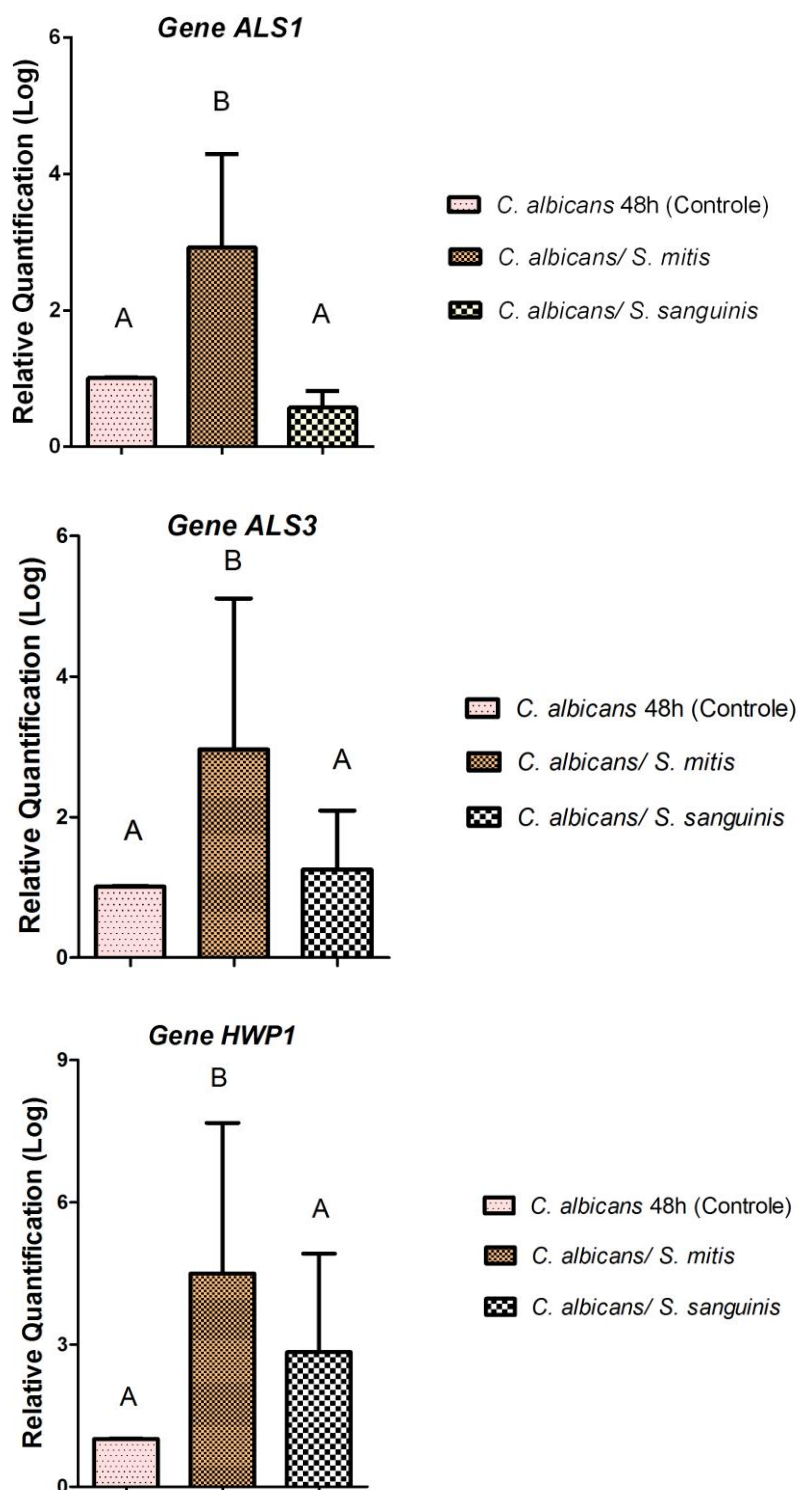


Fonte: Dados analisados pelo ExpressionSuite software.

5.3.2 Genes de aderência

Após a escolha do gene normalizador, a quantidade de transcritos dos genes de aderência *ALS1*, *ALS3* e *HWP1* foram avaliados. Os genes *ALS1*, *ALS3* e *HWP1* foram super expressos na interação de *C. albicans* com *S. mitis*, quando comparados ao grupo controle (*C. albicans*), sendo esta diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Com relação a interação de *C. albicans* com *S. sanguinis*, os genes *ALS3* e *HWP1* também foram super expressos (Figura 10), porém, o gene *ALS1* foi o único sub expresso em relação ao grupo controle, não apresentando diferença estatística significante (Figura 10).

Figura 10 – Quantificação dos transcritos (log) dos genes *ALS1*, *ALS3* e *HWP1* no grupo controle (*C. albicans*) e associações (*C. albicans* e *S. mitis*/*C. albicans* e *S. sanguinis*) determinada pela qPCR.



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante. (teste One-Way ANOVA, $p < 0,05$).

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

5.3.3 Genes de biofilme

Os genes *BRC1*, *CPH1* e *EFG1* foram super expressos na interação de *C. albicans* com *S. mitis*, quando comparados com o grupo controle (*C. albicans*), sendo apenas o gene *CPH1* estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Entretanto os genes foram sub expressos, quando houve a interação de *C. albicans* com *S. sanguinis*, conforme a Figura 11.

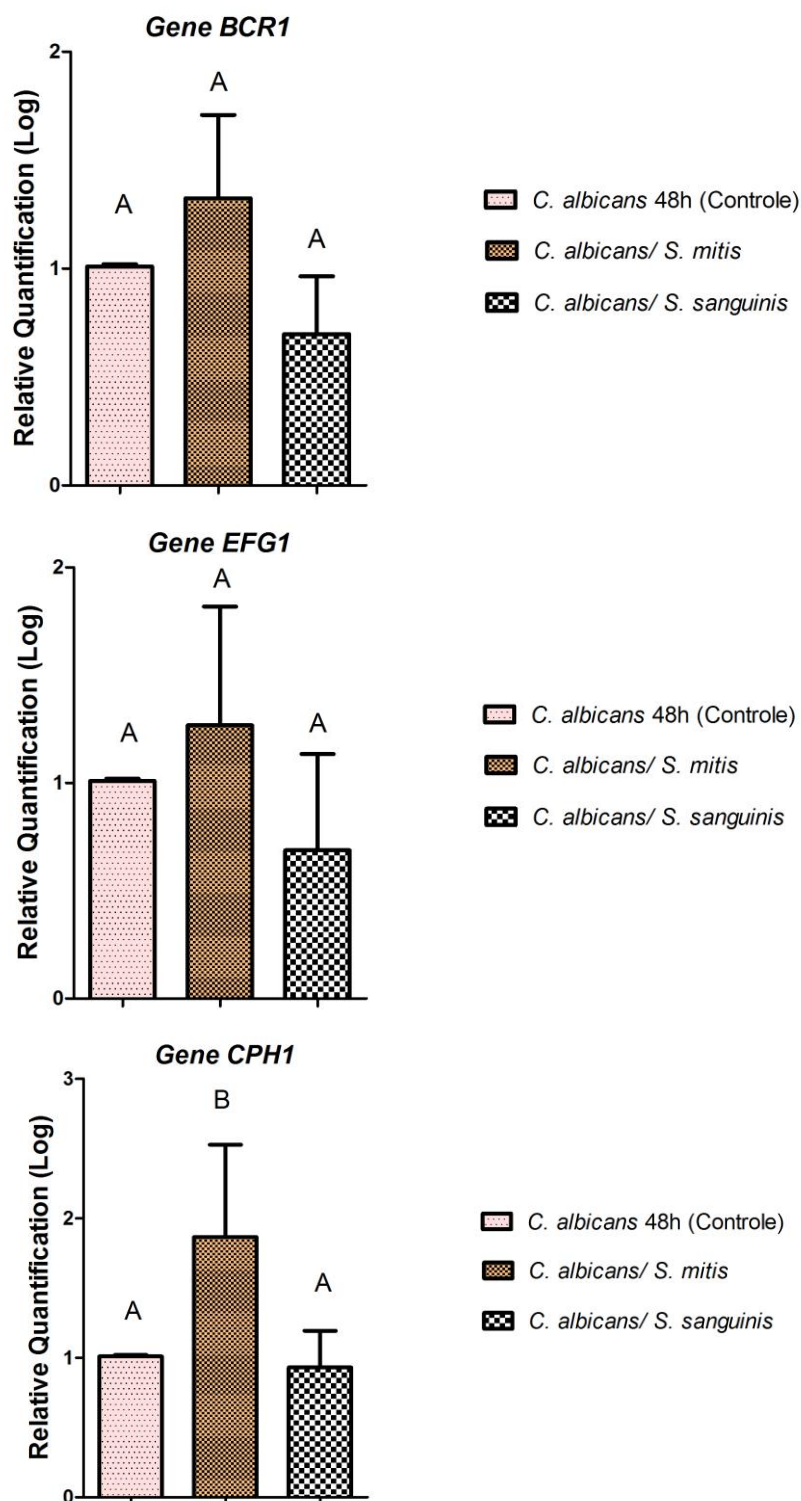
5.4 Interação de *S. mitis* e *S. sanguinis* com *C. albicans* em modelo experimental de *G. mellonella*

5.4.1 Curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Antes do experimento da curva de sobrevivência foi avaliada a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *C. albicans*. Suspensões padronizadas em câmara de Neubauer nas concentrações de 10^6 e 10^7 UFC/larva foram inoculadas em *G. mellonella*. Para cada concentração foram utilizadas 15 lagartas na fase larval final com peso corporal de aproximadamente 260-300 mg. As lagartas foram observadas por 168 h (7 dias) e o número de lagartas mortas anotados diariamente (Figura 12).

A partir dos resultados obtidos, foi escolhida a concentração de 10^6 UFC/larva, para dar continuidade aos experimentos, pois necessitávamos de uma concentração que fosse letal de *C. albicans* para as lagartas, de acordo com o objetivo de estudo.

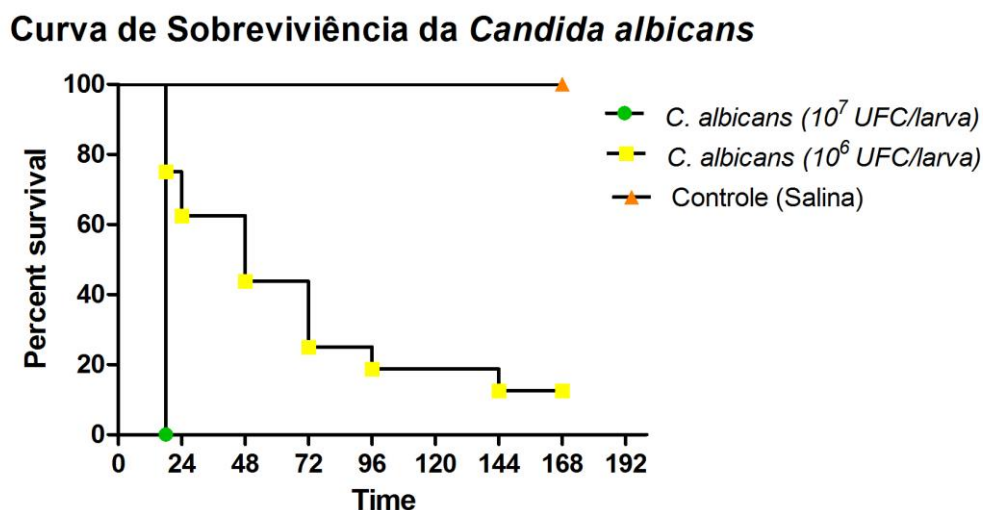
Figura 11 – Quantificação dos transcritos (log) dos genes *BCR1*, *CPH1* e *EFG1* no grupo controle (*C. albicans*) e associações (*C. albicans* e *S. mitis*/*C. albicans* e *S. sanguinis*) determinada pela qPCR.



Legenda: letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. (teste One-Way ANOVA $p < 0,05$).

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

Figura 12 – Curva de sobrevivência da *G. mellonella* do grupo controle *C. albicans*.



Teste Log-rank/Mantel-Cox, $p < 0,05$).

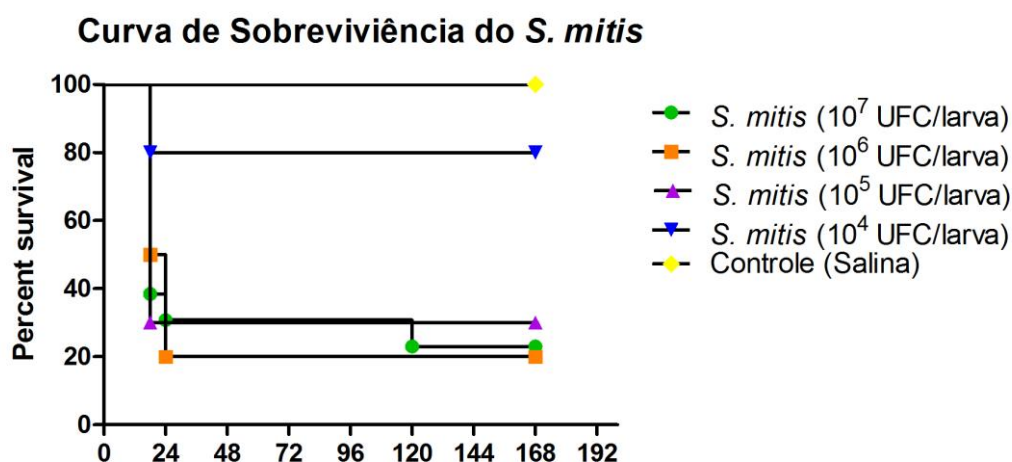
Legenda: o percentual aproximado de sobrevivência das lagartas foi: 0%, 10% e 100% para os grupos, *C. albicans* 10^7 UFC/larva, *C. albicans* 10^6 UFC/larva e Controle (salina) respectivamente.

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

Também foi avaliada a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *S. mitis* e *S. sanguinis*. Suspensões padronizadas em espectrofotômetro nas concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/larva foram inoculadas em *G. mellonella*. Para cada concentração foram utilizadas o mesmo número de lagartas e o peso mencionado anteriormente. As lagartas também foram observadas por 168 h (7 dias) e o número de lagartas mortas anotados diariamente (Figura 13 e 14).

A partir dos resultados obtidos, foi escolhida a concentração subletal de 10^4 UFC/larva, tanto para *S. mitis*, quanto para *S. sanguinis* decorrente do objetivo, visto que eles não poderiam matar todas as lagartas e nem deixar que muitas sobrevivessem.

Figura 13 – Curva de sobrevivência da *G. mellonella* do grupo *S. mitis*.

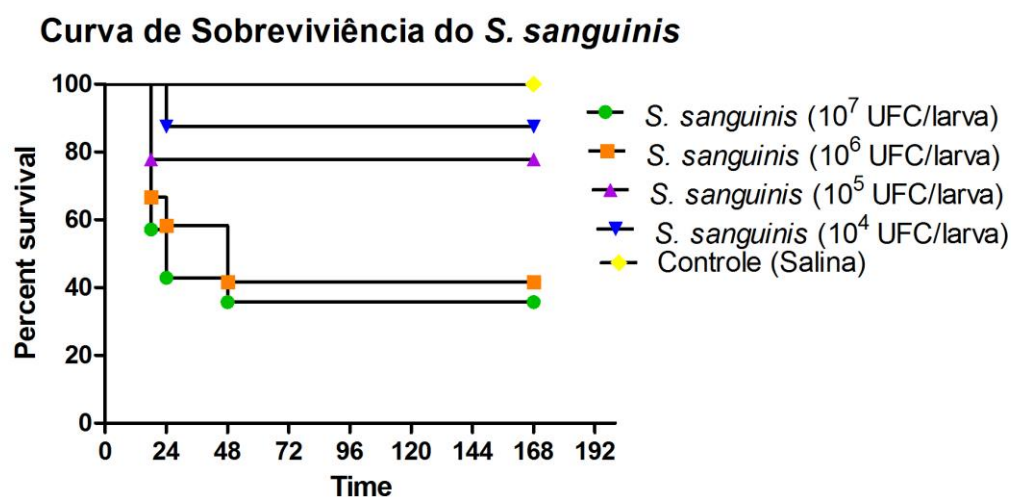


Teste Log-rank/Mantel-Cox ($p < 0,05$).

Legenda: o percentual aproximado de sobrevivência das lagartas foi: 21%, 20%, 30%, 80% e 100% para os grupos, *S. mitis* 10^7 UFC/larva, *S. mitis* 10^6 UFC/larva, *S. mitis* 10^5 UFC/larva, *S. mitis* 10^4 UFC/larva e Controle (salina) respectivamente.

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

Figura 14 – Curva de sobrevivência da *G. mellonella* do grupo *S. sanguinis*.



Teste Log-rank/Mantel-Cox ($p < 0,05$).

Legenda: O percentual aproximado de sobrevivência das lagartas foi: 38%, 41%, 79%, 90% e 100% para os grupos, *S. sanguinis* 10^7 UFC/larva, *S. sanguinis* 10^6 UFC/larva, *S. sanguinis* 10^5 UFC/larva, *S. sanguinis* 10^4 UFC/larva e Controle (salina) respectivamente.

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

5.4.2 Contagem de UFC/mL de biofilme monotípico *C. albicans* e em associação com *S. mitis* e *S. sanguinis* em hemolinfa de *G. mellonella*

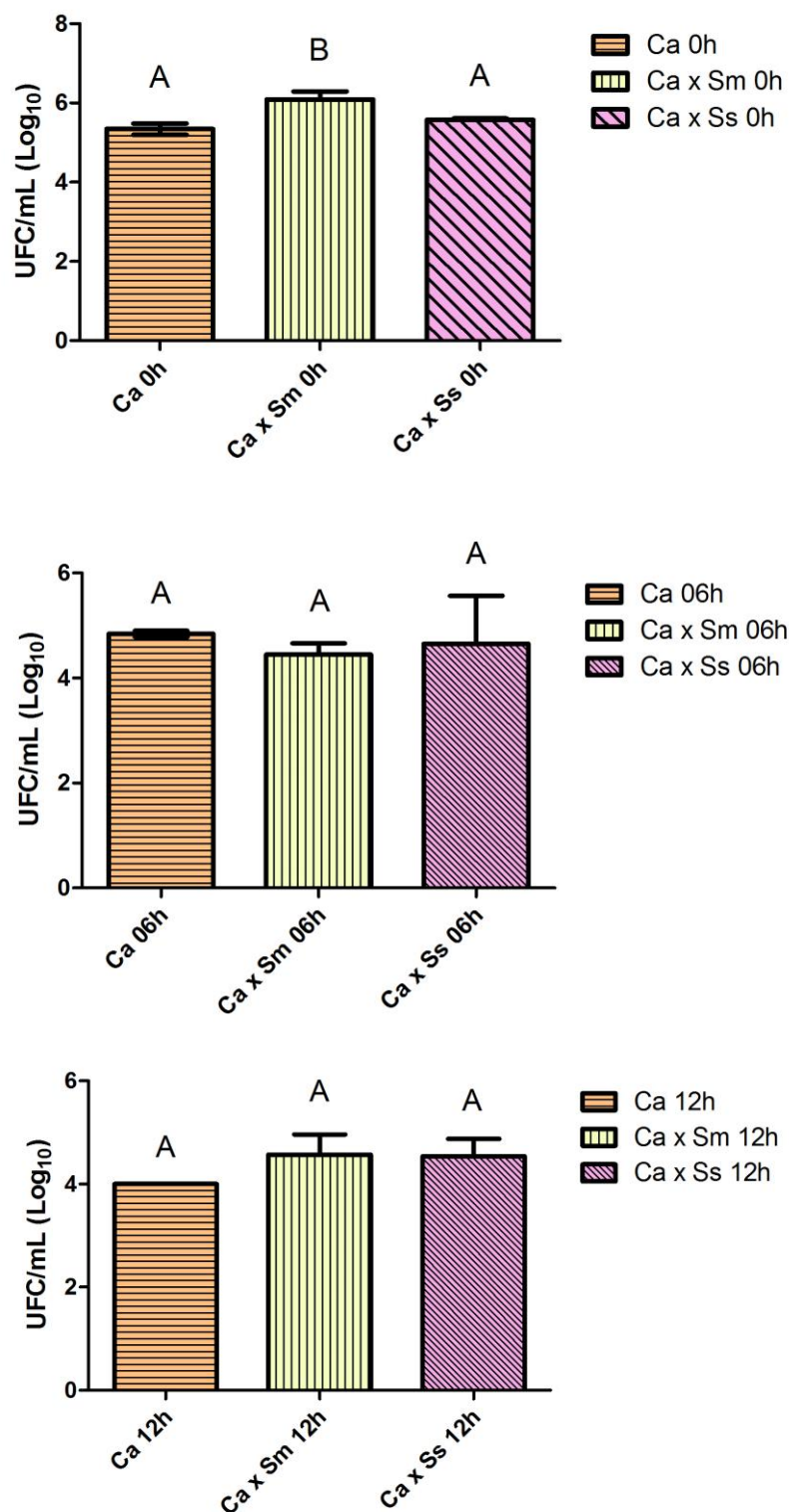
A quantificação da presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella*, foi realizada por meio da eutanásia das lagartas nos tempos de 0, 6 e 12 h após a infecção. A hemolinfa foi diluída e então plaqueada para obtenção dos valores de UFC/mL.

Na Figura 15 está representada a comparação da contagem de UFC/mL (log10) entre os biofilmes isolados de *C. albicans* e a associação de *C. albicans* com *S. mitis* e *C. albicans* com *S. sanguinis* nos períodos de infecção mencionados.

Observa-se nesta figura que o biofilme de *C. albicans* monoespécie apresentou menor crescimento, quando comparado com o biofilme associado com *S. mitis* com diferença estatística ($p = 0,0001$). Porém, quando comparados biofilme de *C. albicans* com *S. sanguinis*, não houve diferença estatística significativa ($p = 0,2318$) no período de 0 h de infecção.

Com relação ao período de infecção de 06 h, em ambas as interações não ocorreu diferença estatisticamente significativa, Ca x Sm ($p = 0,1372$) e Ca x Ss ($p = 0,7984$). O período de infecção de 12 h, também não apresentou diferença estatisticamente significativa, Ca x Sm ($p = 0,1740$) e Ca x Ss ($p = 0,1556$), entretanto no período de 12 h, podemos observar por meio do gráfico que a interação entre os *Streptococcus* promoveu um aumento da UFC/mL de *C. albicans*.

Figura 15 – Análise dos dados de UFC/mL (Log₁₀) no modelo invertebrado de *G. mellonella*, nos períodos de 0 h, 06 h e 12 h de infecção de *C. albicans* e em associação com *S. mitis* (Ca x Sm) e *C. albicans* com *S. sanguinis* (Ca x Ss)



Legenda: letras iguais indicam que não houve diferença estatística. (teste de Tukey, $p < 0,05$).
 Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

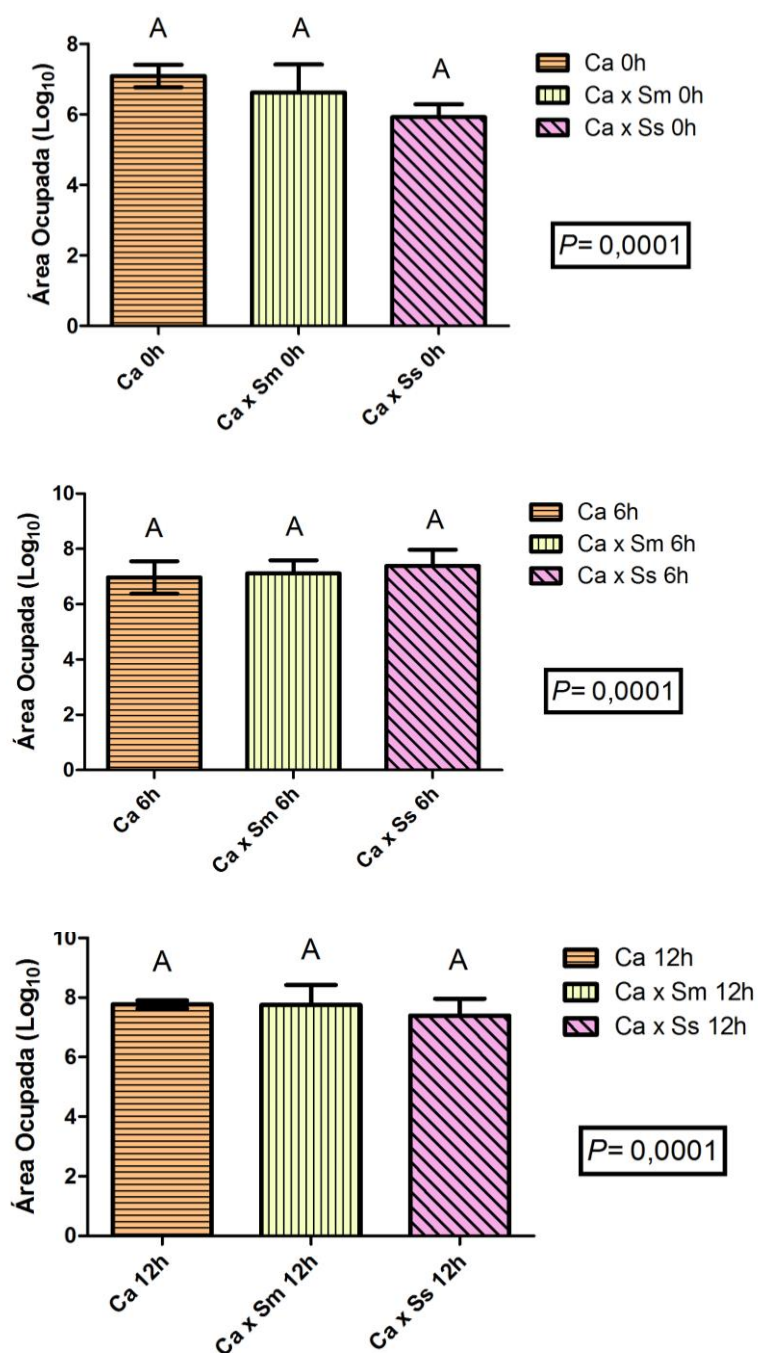
5.4.3 Análise da filamentação *in vivo* em *G. mellonella*

A análise histológica foi realizada para avaliar os efeitos de *S. mitis* e *S. sanguinis* na filamentação de *C. albicans* em *G. mellonella*.

O estudo foi realizado a partir de cortes histológicos do corpo gorduroso da *G. mellonella*, sendo as regiões com presença de hifa e leveduras calculadas por meio da demarcação da área em μm e os valores convertidos em Log de base 10.

Não houve diferença estatisticamente significantes ($p \geq 0,05$) em nenhum dos períodos de infecção, quando se compara o grupo *C. albicans* com suas respectivas interações *S. mitis* e *S. sanguinis* (Figura 16). Todavia, quando visualizados as imagens histológicas (Figura 17, 18 e 19) dos mencionados grupos e períodos de infecção, é nítido o aumento da filamentação de *C. albicans* quando se encontra na interação com *S. mitis* e *S. sanguinis*, conforme visto nas áreas circundadas onde existe a presença de hifa/levedura.

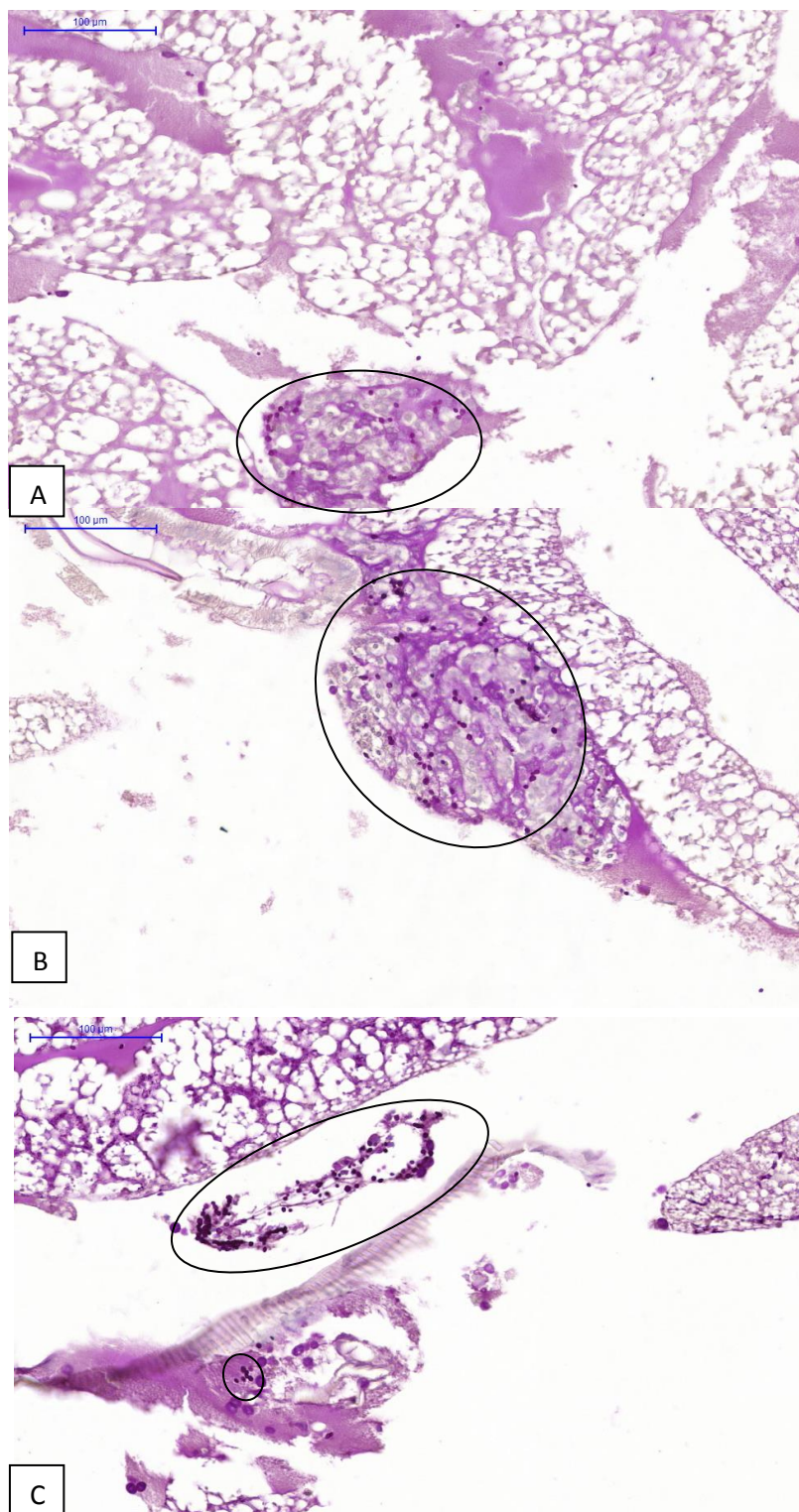
Figura 16 – Análise da filamentação *in vivo* no modelo invertebrado de *G. mellonella*, nos períodos de 0 h (após injeção), 06 h e 12 h de infecção de *C. albicans* e em associação com *S. mitis* (Ca x Sm) e *C. albicans* com *S. sanguinis* (Ca x Ss)



Legenda: letras iguais indicam que não houve diferença estatística. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Dados analisados pelo GraphPad Prism 5.

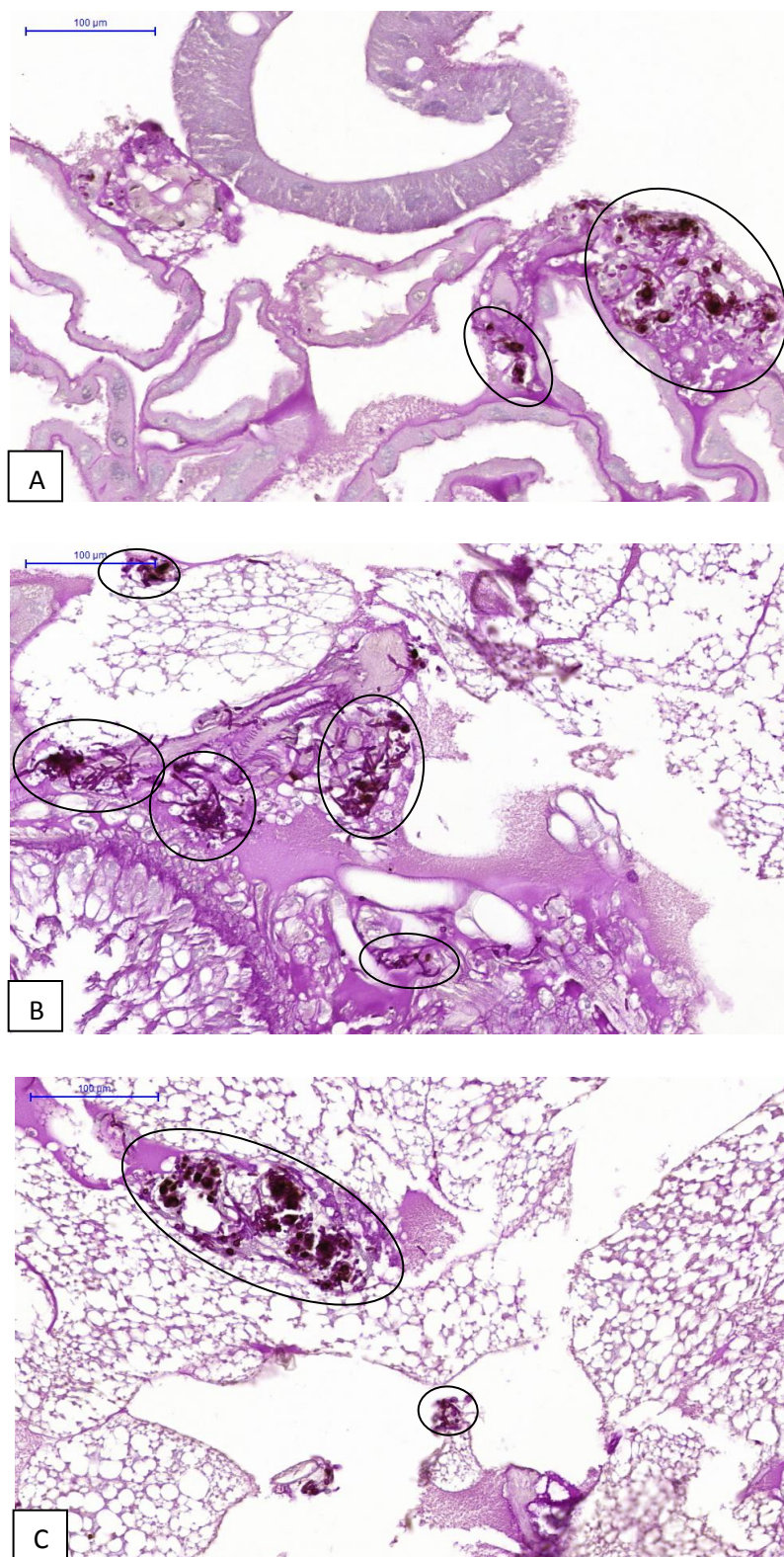
Figura 17 – Análise histológica do corpo gorduroso de *G. mellonella* no período de 0 h (após injeção) no aumento de 40x – coloração ácido periódico de schiff (PAS)



Legenda: A) *C. albicans*; B) *C. albicans* associado com *S. mitis*; C) *C. albicans* associado com *S. sanguinis*.

Fonte: Fotografias retiradas com o software Pannoramic Viewer (3DHITECH) .

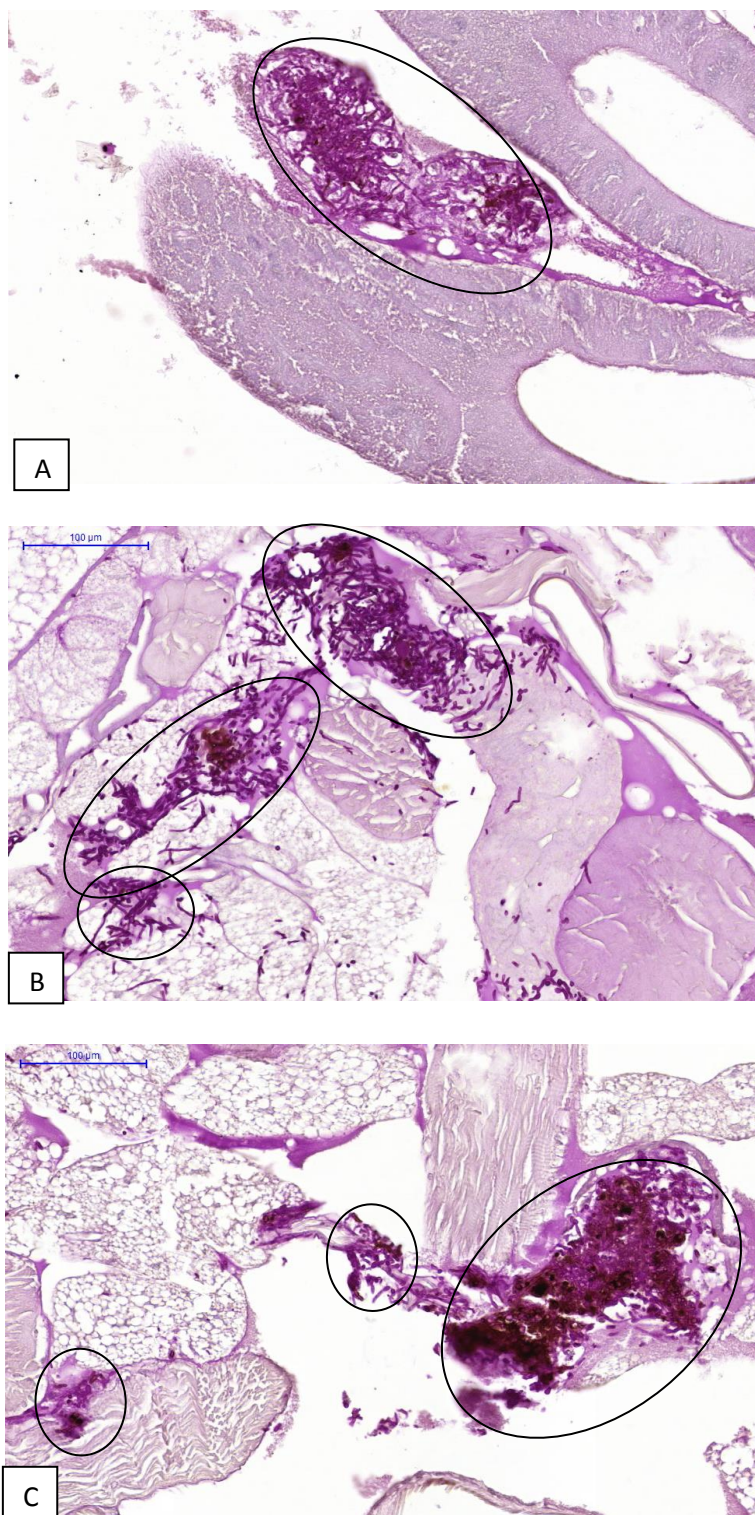
Figura 18 – Análise histológica do corpo gorduroso de *G. mellonella* no período de 06 h de infecção no aumento de 40x – coloração PAS



Legenda: A) *C. albicans*; B) *C. albicans* associado com *S. mitis*; C) *C. albicans* associado com *S. sanguinis*.

Fonte: Fotografias retiradas com o software Pannoramic Viewer (3DHITECH).

Figura 19 – Análise histológica do corpo gorduroso de *G. mellonella* no período de 12 h de infecção no aumento de 40x – coloração PAS



Legenda: A) *C. albicans*; B) *C. albicans* associado com *S. mitis*; C) *C. albicans* associado com *S. sanguinis*.

Fonte: Fotografias retiradas com o software Pannoramic Viewer (3DHITECH).

6 DISCUSSÃO

O biofilme consiste em uma ou mais comunidades de micro-organismos organizados, embebidos em uma matriz ou glicocálice, que recobrem uma superfície sólida, biótica ou abiótica (Costerton et al., 1995; Cieplik et al., 2014; Struzycka et al., 2014; Katharios-Lanwermeier et al., 2014; Wu et al., 2014).

A formação de biofilme dentário, tanto por bactérias, quanto por fungos representa um mecanismo de sobrevivência para os micro-organismos na cavidade bucal (ten Cate et al., 2009; Wright et al., 2013). Os micro-organismos em biofilmes se apresentam encapsulados em uma matriz de glicoproteínas e polissacarídeos, produzidos pelos componentes microbianos (ten Cate et al., 2009).

No presente trabalho avaliamos a interação *in vitro* entre *S. mitis* e *S. sanguinis* com *C. albicans* na formação de biofilme avaliando-se UFC/mL, afim de compreender melhor como os estreptococos interagem com *C. albicans* na formação do biofilme, já que as relações dos micro-organismos em biofilme, poderão favorecer ou inibir o crescimento de uma espécie ou ambas.

O conhecimento sobre como os micro-organismos competem um com o outro, bem como sua possível relação antagonista e os mecanismos naturais de cada um, poderá possibilitar no futuro a descoberta de novas estratégias terapêuticas para as infecções de seres humanos (Peleg et al., 2010).

Os resultados apresentados na formação do biofilme *in vitro* em ambas as interações *C. albicans* e *S. mitis* (Ca x Sm) ($p = 0,0001$) e *C. albicans* e *S. sanguinis* (Ca x Ss) ($p = 0,0001$) apresentaram diferença estatisticamente significativa, demonstrando que os estreptococos influenciaram reduzindo os biofilmes formados por *C. albicans*, em comparação aos biofilmes isolados desta levedura, em 79,37% quando associado com *S. mitis* e 71,44% na

associação com *S. sanguinis*. Esses dados corroboram com os resultados apresentados por Domingues (2014), que realizou a mesma análise do nosso estudo, com os mesmos micro-organismos, apresentando redução de 60,3% e 66,3% respectivamente.

A filamentação *in vitro* também foi analisada no nosso estudo, após 24 h de incubação, mesmo período de análise do biofilme. Os resultados apresentados demonstraram que a interação Ca x Sm foi capaz de inibir a filamentação de *C. albicans*, com diferença estatística significativa ($p = 0,0006$), entretanto a interação com *S. mitis* não foi capaz de inibir a filamentação da mesma forma ($p = 0,1554$).

Apesar de ser um comensal, *C. albicans* é um fungo oportunista, no qual em condições de imunidade comprometida por seu hospedeiro, podem causar candidoses e candidemias. As espécies de *Candida* colonizam cateteres venosos centrais, permitindo um acesso fácil a corrente sanguínea, representando uma problemática relacionada ao combate da infecção (Eggimann et al., 2003; Pfaller et al., 2012; Colombo et al., 2013; Mayer et al., 2013; Sun et al., 2015; Timsit et al., 2015).

Os mecanismos de virulência pelo qual a espécie *C. albicans* desencadeia o início das doenças, ainda não está totalmente esclarecido, porém alguns fatores predisponentes como; capacidade de aderência, produção de hifas ou pseudo-hifas, produção de enzimas hidrolíticas (proteases e fosfolipases) e formação de biofilme nos indicam pela literatura que são variáveis e dependentes de fatores relacionados ao hospedeiro (Zarei et al., 2010; Vinita et al., 2011; Jacobsen et al., 2012; Mayer et al., 2013).

A capacidade de aderência representa um fator determinante para que *Candida* spp. obtenha sucesso na colonização de células hospedeiras e formação de biofilme, que protege as células da levedura em condições não favoráveis e consequentemente, proporciona maior probabilidade de causar

doença (Donohue et al., 2011).

A adesão de *C. albicans* é mediada por uma interação com o receptor das células hospedeiras por meio de adesinas, proteínas presentes na sua complexa parede celular. As adesinas são capazes de reconhecer glicolípidios e carboidratos da célula hospedeira e mediar sua ligação (Coleman et al., 2009; Donohue et al., 2011).

A habilidade de *C. albicans* na formação de biofilme também tem sido associada com a presença da regulação de transcrição de genes (Stichernoth, Ernest, 2009; Finkel, Mitchell; 2011).

A análise da expressão gênica de *C. albicans* foi realizada no presente estudo por meio da técnica de PCR em tempo real, que permite a quantificação relativa da expressão dos genes utilizados no presente estudo. Primeiramente foi realizada a escolha do gene normalizador, sendo analisados a expressão de quatro genes: *ACT1*, *LSC2*, *PMA1* e *RIP1*. Esses genes foram avaliados pelo *software ExpressionSuite* que analisa a estabilidade do gene. Com base nos resultados, o gene de escolha foi *ACT1*.

Após a escolha do gene normalizador, foi realizada a análise dos genes alvos: *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* (genes de aderência) e *BCR1*, *CPH1* e *EFG1* (genes de formação de biofilme). Os genes de aderência *ALS1*, *ALS3*, *HWP1* foram super expressos na interação *C. albicans* com *S. mitis*, bem como *ALS3* e *HWP1* na interação com *S. sanguinis*. Apenas o gene *ALS1* foi subexpresso na interação com *S. sanguinis*.

A família do gene *ALS* codificam 8 glicoproteínas da superfície celular, constituídas de glicosilfosfatilinositol (GPI-Ps). As proteínas ancoradas por GPI-Ps estão envolvidos nos aspectos da interação patógeno-hospedeiro, como a própria adesão e até mesmo invasão das células do hospedeiro em questão (Hoyer, 2001; Nailis et al., 2006; Garcia-Sánchez et al., 2004; Murciano, 2012; Sheppard et al., 2014).

As proteínas codificadas pelos genes *ALS1* e *ALS3* são da família *ALS*, o primeiro tem se mostrado até o momento expresso de maneira abundante em vários modelos de candidoses, onde é capaz de codificar proteínas de ligação tanto em células epiteliais, quanto endoteliais (Sheppard et al., 2014; Cheng et al., 2005; Donohue et al., 2011).

Fazem parte da família *HWP*, os genes *HWP1*, *HWP2* e o *RBT1*, sendo que, suas proteínas são necessárias para aderência à superfície das células hospedeiras, formação de biofilme e agregação celular (de Groot et al., 2013).

A presença do gene *HWP1* permite que *C. albicans* consiga se aderir de forma firme às células da cavidade bucal, por meio de uma ligação cruzada da enzima transglutaminase e as proteínas epiteliais celulares (Sundstrom et al., 2002).

Com relação a expressão dos genes de formação de biofilme neste estudo, a interação de *C. albicans* com *S. mitis* super expressou os genes *BRC1*, *CPH1* e *EFG1*. Todavia, os mesmos genes foram subexpressos na interação com *S. sanguinis*.

No mecanismo de regulação gênica de *C. albicans*, o gene *EFG1* possui a função de regular um número grande de genes, e um deles é o gene *CPH1* analisado no presente estudo. O *CPH1* é relacionado com filamentação e mudança fenotípica em *C. albicans*. Estudos apontam que a deleção do referido gene, provoca efeito de grande redução na formação de hifas, ou até mesmo ausência da sua formação (Staniszewska et al., 2013; Wartenberg et al., 2014; Maiti et al., 2015).

Estudos *in vitro*, tem possibilitado o entendimento das interações e mecanismo de ação entre os micro-organismos. Modelos murinos foram também largamente utilizados para esta finalidade, porém, suas limitações éticas, custo elevado e necessidade de local adequado e treinamento especializado para seu manejo tem levado à utilização de outros modelos

alternativos.

Uma variedade de modelos invertebrados, como *G. mellonella* (lagarta da mariposa), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), *Manduca sexta* (verme do tabaco) e *Bombyx mori* (verme da seda), insetos que possuem muitas vantagens, incluindo facilidade de inoculação, na necessidade de apuração por comitê de ética, uso em larga escala levou a utilização destes modelos para estudo de interações microbianas (Kavanagh, Reeves, 2004; Fuchs, Mylonakis, 2006). Além destas vantagens os resultados utilizando modelos invertebrados podem ser obtidos dentro de espaço de tempo relativamente curto (24 a 48 h) (Kemp, Massay, 2007).

O modelo escolhido no presente estudo foi a *G. mellonella*, obtida de criadouro próprio. Este modelo foi utilizado inicialmente para estudo de fungos entomopatogênicos, ou seja, fungos que parasitam insetos (Gotz et al., 1997), e atualmente tem se demonstrado um excelente modelo invertebrado para estudos de infecções humanas causadas por bactérias (Lopez-Hernández et al., 2015; Olszak et al., 2015; Pereira et al., 2015; Giannouli et al., 2014), fungos (Arvanitis et al., 2013; Sherry et al., 2014; Zdybicka-Barabas et al., 2015) e relacionadas ao estudo de eficácia e resistência à antimicrobianos (Hill et al., 2014; Yang et al., 2014).

Em nosso estudo, avaliamos os efeitos *in vivo* de *S. mitis* e *S. sanguinis* sobre a candidose experimental em *G. mellonella*. Os períodos de infecção analisados em ambos os ensaios, foram de 0 h, 6 h e 12 h. A interação de Ca x Sm apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,0001$), entretanto a interação com *S. sanguinis* não apresentou os mesmos valores ($p = 0,2318$). Nos períodos de infecção de 6 h nos respectivos grupos, não foram apresentados resultados estatisticamente significantes; Ca x Sm ($p = 0,1372$) e Ca x Ss ($p = 0,7984$). O mesmo ocorreu no tempo de 12 h de infecção Ca x Sm ($p = 0,1740$) e Ca x Ss ($p = 0,1556$).

Apesar dos tempos de 6 h e 12 h não terem apresentado diferença estatística, quando analisamos os valores em porcentagem, verificamos que no período de 0 h, a interação com *S. mitis* e *S. sanguinis*, aumentou a filamentação de *C. albicans* em 13,67% e 2% respectivamente. Em 6 h, reduziu a filamentação em 8,70% e 3,92% e aumentou novamente a filamentação do fungo em 14,25% e 13,50% no período de 12 h.

No estudo realizado por Barbosa et al. (2016) que analisou a interação do *Streptococcus mutans*, pertencente ao grupo *mutans*, analisou a UFC/mL, após infecção em *G. mellonella*, entretanto nos períodos de 0 h, 08 h e 12 h. Os autores verificaram que no tempo de 0 h, o número de UFC/mL era de aproximadamente 6 Log, decaindo para 4-5 Log depois de 08 h e aumentando para 6 Log depois de 12 h. Contudo assim como nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre a interação e o grupo controle.

O ensaio realizado para filamentação *in vivo*, onde as áreas de hifas e leveduras de cada corte histológico foram somadas e o resultado convertido para logaritmo de base 10 para realização da análise estatística, em nenhum dos períodos de infecção (0 h, 6 h e 12 h) apresentou diferença estatisticamente significativa.

As interpretações dos resultados, parecem indicar um aumento da virulência de *C. albicans* quando encontra-se em associação com *S. mitis*, visto que esta interação super expressou todos os genes analisados, tanto de formação de biofilme, quanto nos genes de aderência de *Candida albicans*.

Jenkinson et al. (1990) demonstrou que a interação de *Candida* com os estreptococos, está no aproveitamento do lactato, proveniente do metabolismo dos estreptococos, utilizando o metabólito descartado como fonte de carbono. Recentemente o mesmo autor, publicou um estudo com Xu et al. (2014b) para esclarecer ainda mais o mecanismo complexo de interação

Streptococcus-Candida. Quando analisamos a interação com *S. sanguinis*, os resultados parecem indicar uma diminuição da virulência de *C. albicans* ou atuação com a mesma protocooperação. Esta interação parece poder promover aderência de *C. albicans* a colonizadores pioneiros do biofilme com aproveitamento de nutrientes.

Os trabalhos de em O'Sullivan et al. (2000) e Xu et al. (2014b) apontam que a relação de *C. albicans* com *S. sanguinis*, é muito vantajosa para o fungo, em razão de que a levedura poderá se aderir/fixar no biofilme com maior facilidade. *S. sanguinis* é considerado como colonizador pioneiro do biofilme bucal humano; assim a aderência de *C. albicans* ao biofilme inicial contendo *S. sanguinis* facilita a presença da levedura no biofilme, pois não precisará competir com outros tipos de micro-organismos. Em nosso estudo a interação *C. albicans* com *S. sanguinis* não foi capaz de impedir a filamentação de *C. albicans* ($p = 0,1554$) o que nos leva a supor que o estreptococo não interferiu com o crescimento do biofilme “*in vitro*”.

Com relação a expressão de genes, acreditamos que pode diminuir a virulência de *Candida*, pois a interação subexpressou genes de formação de bifilme, por exemplo, entretanto, super expressou genes de aderência, como *ALS3* e *HWP1*.

Apesar do nosso estudo não apresentar valores estatisticamente significantes, o modelo de *G. mellonella*, tem sido utilizado por vários estudos para determinar a virulência de *Candida albicans* e a eficácia do tratamento antifúngico, como o estudo realizado por Ribeiro et al. (2016) que avaliou os potenciais efeitos anti-*Candida* do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* no modelo *in vivo*.

Os autores observaram que o tratamento com sobrenadante aumentou em 80% a sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*.

Em Aneja et al. (2016), os autores empregaram o modelo de *G. mellonella*, para estudo da síntese de novos híbridos de triazol-aminoácidos com potente actividade inibitória *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *Candida*.

Segundo Aneja et al. (2016), os estudos sobre as larvas de *Galleria mellonella* mostraram que os inibidores de chumbo 68 e 70, selecionados no estudo, não eram tóxicos, não provocaram resposta imune e reduziram significativamente a proliferação de *Candida in vivo*, demonstrando que o modelo é eficaz não apenas para estudos de potenciais de virulência, entretanto, também, para análise de potencial antifúngico de determinados fármacos.

De acordo com nossos resultados, salientamos a importância de maiores estudos que analisem a interação de *C. albicans* no modelo, em interação com *S. mitis* e *S. sanguinis*, visto que nosso estudo é um dos primeiros até o presente momento que analisou essa interação. Estudos que analisam apenas fatores de virulência dos estreptococcus (Evans, Rozen, 2012; Loh et al., 2013) foram realizados, entretanto sem a interação com a levedura do gênero *Candida*.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- a) Nos estudos *in vitro*, *S. mitis* e *S. sanguinis* foram capazes de diminuir a quantidade de *C. albicans* no biofilme. A interação *C. albicans* com *S. mitis* inibiu a filamentação da mesma;
- b) Na análise da expressão gênica, a interação *S. mitis* com *C. albicans*, aumentou a expressão dos genes de aderência *ALS1*, *ALS3* e *HWP1*. Na associação com *S. sanguinis* os genes *ALS3* e *HWP1* também aumentaram sua expressão. Com relação aos genes de formação de biofilme, *BRC1*, *CPH1* e *EFG1*, apenas na interação com *S. mitis* houve aumento da expressão destes genes;
- c) Em *G. mellonella*, não foi possível observar ação de inibição pelos estreptococos no modelo experimental *in vivo* na filamentação de *C. albicans* nos tecidos e na contagem de UFC/mL.

REFERÊNCIAS*

Aneja, B, Irfan M, Kapil C, Jairajpuri MA, Maguire R, Kavanagh K et al. Effect of novel triazole-amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: in vitro and in vivo studies. *Org Biomol Chem*. 2016 Dec 7;14(45):10599-10619. doi: 10.1039/C6OB01718E.

Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep; 1832(9):1378-83. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.03.008.

Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, Piard JC, Naitali M, Briandet R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiol*. 2015 Feb;45(Pt B):167-78. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.015..

Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, de Alvarenga JA, Velloso Mdos S, Prata MC et al. *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016 Mar 2;11(3):e0150457. doi: 10.1371/journal.pone.0150457.

Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL, Jr., Trupin SR, Hoyer LL. Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2005 Mar; 73(3):1656-63. doi: 10.1128/IAI.73.3.1656-1663.2005.

Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014 Aug 12;5: 405. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.

Coleman DA, Oh SH, Zhao X, Zhao H, Hutchins JT, Vernachio JH, et al. Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells in vitro and in vivo and block adhesion to host surfaces. *J Microbiol Methods*. 2009 Jul;78(1):71-8. doi: 10.1016/j.mimet.2009.05.002.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Colombo AL, Guimaraes T, Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles F, Salles MJ, et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis.* 2013 May-Jun;17(3):283-312. doi: 10.1016/j.bjid.2013.02.001.

Connolly LA, Riccombeni A, Grozer Z, Holland LM, Lynch DB, Andes DR, et al. The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *Mol Microbiol.* 2013 Oct;90(1):36-53. doi: 10.1111/mmi.12345.

Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses.* 2013 Nov;56(6):614-22. doi: 10.1111/myc.12092.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.

de Groot PW, Bader O, de Boer AD, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot Cell.* 2013 Apr;12(4):470-81. doi: 10.1128/EC.00364-12.

Del Pozo JL, Cantón E. *Candida* biofilm-related infections. *Rev Iberoam Micol.* 2016 Jul-Sep;33(3):176-83. doi: 10.1016/j.riam.2015.06.004.

Di Giulio M, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Sancilio S, Marsich E, Travan A, et al. The effect of a silver nanoparticle polysaccharide system on streptococcal and saliva-derived biofilms. 2013 Jun 28;14(7):13615-25. doi: 10.3390/ijms140713615.

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 Feb;80(2):620-32. doi: 10.1128/IAI.05896-11.

Donohue DS, Ielasi FS, Goossens KV, Willaert RG. The N-terminal part of Als1 protein from *Candida albicans* specifically binds fucose-containing glycans. *Mol Microbiol.* 2011 Jun;80(6):1667-79. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07676.x.

Domingues N. Biofilmes multiespécies de *Candida albicans* associados com *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):685-702. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00801-6

Evans BA, Rozen, DE. *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct;31(10):2653-60. doi: 10.1007/s10096-012-1609-7

Fanning S, Xu W, Solis N, Woolford CA, Filler SG, Mitchell AP. Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator *Bcr1* *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot Cell.* 2012 Jul;11(7):896-904. doi: 10.1128/EC.00103-12.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology.* 2011 Feb;9(2):109-18. doi: 10.1038/nrmicro2475.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9(4):346-51. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.004

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 Jun;12(6):488-96. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.001.

García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell*. 2004 Apr;3(2):536-45. doi: 10.1128/EC.3.2.536-545.2004

Giaouris E, Heir E, Hebraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Moretro T, et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci*. 2014;97(3):298-309.

Giannouli M, Palatucci AT, Rubino V, Ruggiero G, Romano M, Triassi M, et al. Use of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol*. 2014 Aug 27;14:228. doi: 10.1186/s12866-014-0228-0.

Gotz P, Matha V, Vilcinskas A. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol*. 1997 Nov;43(12):1149-1159. doi: 10.1016/S0022-1910(97)00066-8.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.

Gutierrez D, Rodriguez-Rubio L, Martinez B, Rodriguez A, Garcia P. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front Microbiol*. 2016 Jun 8;7:825. doi: 10.3389/fmicb.2016.00825.

Han TL, Cannon RD, Villas-Boas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol*. 2011 Aug;48(8):747-63. doi: 10.1016/j.fgb.2011.04.002.

Hill L, Veli N, Coote PJ. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas*

aeruginosa infection. Int J Antimicrob Agents. 2014 Mar;43(3):254-61. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.11.001.

Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schock U, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. PLoS Genet. 2012;8(12):e1003118. doi: 10.1371/journal.pgen.1003118.

Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001 Apr;9(4):176-80. doi: 10.1016/S0966-842X(01)01984-9

Hsu CC, Lai WL, Chuang KC, Lee MH, Tsai YC. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. Med Mycol. 2013 Jul;51(5):473-82. doi: 10.3109/13693786.2012.743051.

Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012 Jan;10(1):85-93. doi: 10.1586/eri.11.152.

Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. Oral Dis. 2010 Nov;16(8):729-39. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01701.x.

Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH. Community interactions of oral streptococci. Adv Appl Microbiol. 2014;87:43-110. doi: 10.1016/B978-0-12-800261-2.00002-5.

Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. Infect Immun. 1990 May;58(5):1429-36.

Lassak T, Schneider E, Bussmann M, Kurtz D, Manak JR, Srikantha T, et al. Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator. Mol Microbiol. 2011 Nov;82(3):602-18. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07837.x.

Liu H, Kohler J, Fink GR. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. Science. 1994 Dec 9;266(5191):1723-6.

Lopez-Hernandez Y, Yero D, Pinos-Rodriguez JM, Gibert I. Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2015 Feb 4;6:38. doi: 10.3389/fmicb.2015.00038.

Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence.* 2013 Jul 1;4(5):419-28. doi: 10.4161/viru.24930.

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

Katharios-Lanwermyer S, Xi C, Jakubovics NS, Rickard AH. Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. *Biofouling.* 2014;30(10):1235-51. doi: 10.1080/08927014.2014.976206.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 Feb;28(1):101-12. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002.

Kemp M, Massey RC. The use of insect models to study human pathogens. *Drug Discov Today.* 2007; 4(3):105-10. doi: 10.1016/j.ddmod.2007.06.007.

Maiti P, Ghorai P, Ghosh S, Kamthan M, Tyagi RK, Datta A. Mapping of functional domains and characterization of the transcription factor Cph1 that mediate morphogenesis in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2015 Oct;83:45-57. doi: 10.1016/j.fgb.2015.08.004.

Mancl KA, Kirsner RS, Ajdic D. Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. *Wound Repair Regen.* 2013 May-Jun;21(3):352-62. doi: 10.1111/wrr.12034.

Marchais V, Kempf M, Licznar P, Lefrancois C, Bouchara JP, Robert R, et al. DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to adherence to polystyrene. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Apr 1;245(1):25-32. doi: 10.1016/j.femsle.2005.02.014.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013 Feb 15;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913.

Mitchell J. *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol oral microbiol*. 2011 Apr;26(2):89-98. doi: 10.1111/j.2041-1014.2010.00601.x.

Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL, et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PloS One*. 2012;7(3):e33362. doi: 10.1371/journal.pone.0033362.

Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):3833-41. doi: 10.1128/IAI.73.7.3833-3841.2005.

Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2006 Aug 4;7:25. doi: 10.1186/1471-2199-7-25.

Nobbs AH, Jenkinson HF, Everett DB. Generic determinants of *Streptococcus* colonization and infection. *Infect Genet Evol*. 2015 Jul;33:361-70. doi: 10.1016/j.meegid.2014.09.018.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69:71-92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.

Olszak T, Zarnowiec P, Kaca W, Danis-Wlodarczyk K, Augustyniak D, Drevinek P, et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(14):6021-33.

O'Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology*. 2000 Jan;146 (Pt 1):41-8. doi: 10.1099/00221287-146-1-41.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2010 May; 8(5):340-9. doi: 10.1038/nrmicro2313.

Perdoni F, Falleni M, Tosi D, Cirasola D, Romagnoli S, Braidotti P, et al. A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Histochem.* 2014 Sep 23;58(3):2428. doi: 10.4081/ejh.2014.2428.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011 May;26(3):341-8. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3.

Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012 Jan; 125(1 Suppl):S3-13. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.11.001.

Pierce JV, Kumamoto CA. Variation in *Candida albicans* EFG1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio.* 2012 Jul 24;3(4):e00117-12. doi: 10.1128/mBio.00117-12.

Ramirez-Zavala B, Weyler M, Gildor T, Schmauch C, Kornitzer D, Arkowitz R, et al. Activation of the Cph1-dependent MAP kinase signaling pathway induces white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Patho.* 2013;9(10):e1003696. doi: 10.1371/journal.ppat.1003696.

Ribeiro, FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *Appl Microbiol.* 2017 Jan;122(1):201-211. doi: 10.1111/jam.13324.

Rukke HV, Hegna IK, Petersen FC. Identification of a functional capsule locus in *Streptococcus mitis*. *Mol Oral Microbiol.* 2012 Apr;27(2):95-108. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00635.x.

Serrano-Fujarte I, Lopez-Romero E, Reyna-Lopez GE, Martinez-Gamez MA, Vega-Gonzalez A, Cuellar-Cruz M. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. *Biomed Res Int.* 2015;2015:783639. doi: 10.1155/2015/783639.

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. doi: 10.1371/journal.pone.0060047.

Stichternoth C, Ernst JF. Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. Appl Environ Microbiol. 2009 Jun;75(11):3663-72. doi: 10.1128/AEM.00098-09.

Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. Braz J Microbiol. 2013 Dec 10;44(3):813-21. doi: 10.1590/S1517-83822013005000056.

Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E, Soll DR. Identification of genes upregulated by the transcription factor *Bcr1* that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* α/α biofilms. Eukaryot Cell. 2013 Jun;12(6):875-88. doi: 10.1128/EC.00071-13.

Sundstrom P. Adhesins in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 1999 Aug;2(4):353-7. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80062-9.

Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):30480-9. doi: 10.1074/jbc.M401929200.

Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, Borghi E, Perdoni F, Falleni M, et al. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. BMC Microbiol. 2014 Jul 5;14:182. doi: 10.1186/1471-2180-14-182.

Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol. 2014;63(2):127-35.

Sun L, Liao K, Wang D. Effects of Magnolol and Honokiol on Adhesion, Yeast-Hyphal Transition, and Formation of Biofilm by *Candida albicans*. PloS One. 2015 Feb 24;10(2):e0117695. doi: 10.1371/journal.pone.0117695.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009 Feb;88(2):105-15. doi: 10.1177/0022034508329273.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol. 2006 Aug;51(8):672-80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.02.005.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009 Nov;52(6):467-75. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01719.x.

Timsit JF, Chemam S, Bailly S. Empiric/pre-emptive anti-*Candida* therapy in non-neutropenic ICU patients. 2015 Feb 3;7:21. doi: 10.12703/P7-21.

Van Meervenne E, De Weirde R, Van Coillie E, Devlieghere F, Herman L, Boon N. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? Pathog Dis. 2014 Apr;70(3):332-8. doi: 10.1111/2049-632X.12134.

Vilela SF, Barbosa OJ, Rossoni RD, JD Santos, MC Silver Anbinder AL, Jorge AO, Junqueira JC. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. Virulence. 2015;6(1):29-39. doi: 10.4161/21505594.2014.981486.

Vinitha M, Mamatha B. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence; biofilm formation, proteinase and phospholipase production; a study on hospitalized patients in Sourthern India. J Global Infect Dis. 2011 Jan;3(1):4-8. doi: 10.4103/0974-777X.77288.

Wartenberg A, Linde J, Martin R, Schreiner M, Horn F, Jacobsen ID, et al. Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. PLoS Genet. 2014 Dec 4;10(12):e1004824. doi: 10.1371/journal.pgen.1004824.

Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Apr;28(2):83-101. doi: 10.1111/omi.12012.

Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2014; 23;7(1):1-7.

Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cellular microbiology*. 2014 Feb;16(2):214-31. doi: 10.1111/cmi.12216.(a)

Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Jun;29(3):99-116. doi: 10.1111/omi.12049.(b)

Yang HF, Pan AJ, Hu LF, Liu YY, Cheng J, Ye Y, et al. *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the efficacy of antimicrobial agents against *Enterobacter cloacae* infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Nov 22. pii: S1684-1182(14)00241-2. doi: 10.1016/j.jmii.2014.11.011.

Zarei Mahmoudabadi A, Zarrin M, Miry S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. *Jundishapur J Microbiol*. 2010 May; 3:169-73.

Zdybicka-Barabas A, Sowa-Jasilek A, Staczek S, Jakubowicz T, Cytrynska M. Different forms of apolipoprotein III in *Galleria mellonella* larvae. 2015 Jun;68:105-12. doi: 10.1016/j.peptides.2014.12.013.