



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



Carmélia Isabel Vitorino Lobo

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

Araraquara

2018



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



Carmélia Isabel Vitorino Lobo

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

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

Orientadora: Marlise Inêz Klein

Araraquara

2018

Lobo, Carmélia Isabel Vitorino

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

69 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

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

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

Carmélia Isabel Vitorino Lobo

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

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

2ª Examinadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa

3ª Examinadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

Araraquara, 26 de Fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

Carmélia Isabel Vitorino Lobo

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

FILIAÇÃO: Josethe Maria Amado Vitorino e Augusto Francisco Lobo

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

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

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

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

Obrigada por acreditarem 'comigo'

Com vocês do meu lado, tudo posso

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A Deus que está sempre comigo e nunca me falta;

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

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

A minha irmã Erica Célia Jessen muito paciente;

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

A professora Ana Cláudia Pavarina, pela carta de aceite;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Luana Sales pela colaboração e parceria;

A Paula Aboud Barbugli pela colaboração;

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

A Maria Inês Carlos pelo carinho e amizade;

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar *in vitro* as características fenotípicas e genotípicas do biofilme misto e simples de *S. mutans* e de *C. albicans* e os mecanismos através dos quais a interação entre essas espécies pode influenciar a virulência do biofilme.

2.1 Objetivos Específicos

1. Verificar e quantificar o pH do meio de cultura, a população microbiana, as proteínas e os exopolissacarídeos solúveis e insolúveis em água de biofilmes misto e simples de *S. mutans* e de *C. albicans*.
2. Analisar e descrever a estrutura tridimensional dos biofilmes misto e simples de *S. mutans* e de *C. albicans*.
3. Interpretar o nível de expressão gênica de *S. mutans* e de *C. albicans* em biofilmes simples e misto.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cárie Dentária

Durante anos o entendimento de cárie dentária se limitou a presença de tecido cariado (constituído por bactérias causadoras de infecção e desmineralização dental), havendo necessidade de eliminação desse tecido para o seu controle. Porém, a cárie dentária resulta de interações complexas entre microrganismos orais específicos, fatores do hospedeiro e dieta, que promovem o estabelecimento de um biofilme cariogênico (com potencial de causar cavitação) na superfície dos dentes²². Atualmente, a cárie é considerada como um desequilíbrio ecológico do biofilme dental, na presença de carboidratos da dieta. Os microrganismos produzem e retêm ácidos na matriz extracelular (MEC) rica em exopolissacarídeos (EPS), resultando no desequilíbrio entre o ganho de minerais pela saliva e a perda de minerais pelo processo de desmineralização, e consequentemente instalação da lesão cariosa^{23,24}.

O ecossistema da cavidade bucal é considerado complexo, pela presença de microrganismos ácido sensíveis e ácido resistentes (acidúricos). Os microrganismos formam ácido por fermentação de carboidratos, sendo o mais comum deles o ácido láctico. A presença deste, promove perda de fosfato de cálcio e desmineralização das superfícies de esmalte e / ou dentina, iniciando a lesão de cárie. Lesões cavitadas surgem após períodos de desmineralização dos tecidos duros, e servem de porta de entrada e colonização de microrganismos; quando não controladas, podem levar a perda do elemento dentário, além de causar outras infecções como a endocardite bacteriana²³.

3.2 Epidemiologia da Cárie Dentária

A saúde bucal não registrou melhorias entre os anos 1990-2015 e apesar de sua relevância, cerca de 3,5 bilhões de pessoas no mundo sofrem com consequências das condições bucais não tratadas²⁵. Dentre as doenças causadas por biofilmes, a cárie dentária continua sendo um problema de saúde pública mundial, afetando cerca 2,5 bilhões de crianças e adultos em todo mundo²⁵⁻²⁷. Depois do resfriado comum, a cárie dentária é considerada a doença mais prevalente em humanos²⁸. A colonização por *S. mutans* em crianças pode ocorrer logo após erupção dentária e estes microrganismos apresentam proteínas específicas de ligação a superfície dentária, facilitando a sua colonização²⁸, porém tem se verificado a presença deste

microrganismo antes dos três meses de idade (transmissão de mãe para filho)²⁹. Ainda, prevalência da cárie precoce da infância (do inglês *early childhood caries* ou ECC) é considerada alta tanto em países industrializados como nos em desenvolvimento, variando de 28-82%²⁹.

3.3 Interação entre *S. mutans* e *C. albicans* para a formação de biofilme

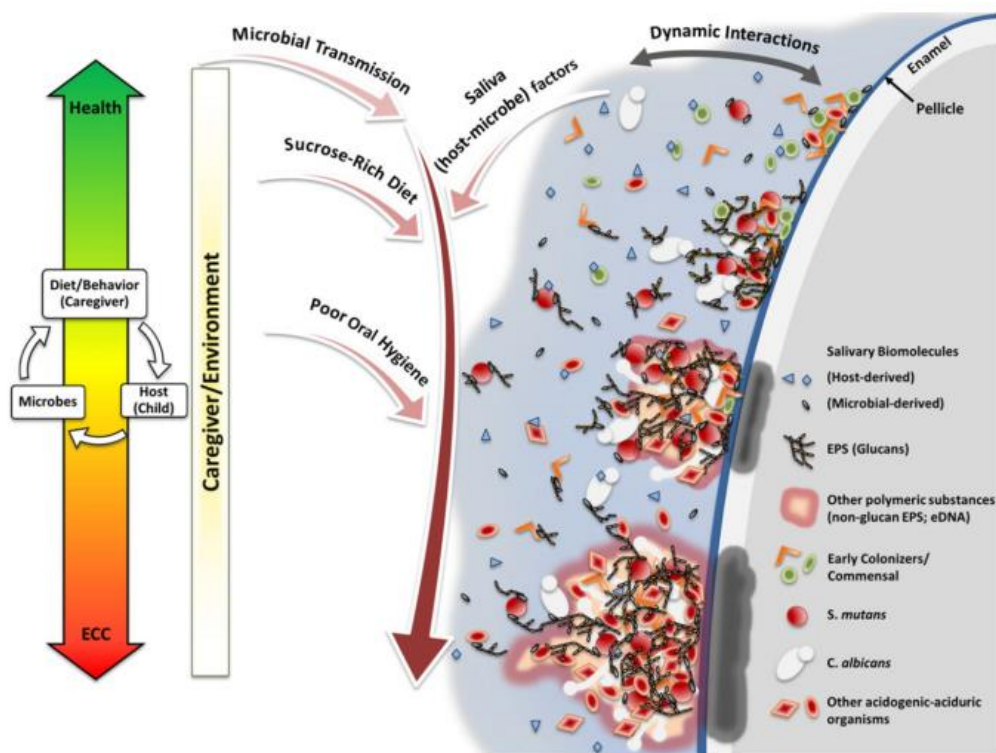
Muitas doenças infecciosas humanas são causadas por biofilmes virulentos, incluindo os biofilmes orais. Na formação de biofilmes se observam interações de cooperação e competição entre vários microrganismos de estrutura heterogênea, produção de matriz de substâncias poliméricas que se acumulam na superfície dentária produzindo microambientes. Essas interações influenciam a formação do biofilme, mudanças metabólicas nos microrganismos, além das funções fisiológicas dos mesmos envolvendo mecanismos diferentes³⁰. As células microbianas se ligam fisicamente e de forma direta às superfícies da cavidade bucal, ou indiretamente ao se juntarem a outros colonizadores iniciais. Ainda, a comunicação entre esses microrganismos pode ocorrer por vias metabólicas, trocas genéticas, “quorum sensing” (processo químico de comunicação entre os microrganismos). Contudo, fatores do hospedeiro, como a idade, sexo, sistema imunológico, genética, podem influenciar a composição microbiana e o seu metabolismo. Ao colonizarem as superfícies dentárias, as bactérias orais formam ligações com as proteínas da saliva (como α -amilase, proteína ricas em prolina), formando a placa dentária inicial³⁰.

Além de todos mecanismos mencionados acima para a formação do biofilme, ocorre a co-agregação, processo pelo qual os microrganismos geneticamente diferentes se ligam entre si via moléculas específicas, considerado importante para formação de biofilme multiespécies. Este processo ocorre quando colonizadores iniciais através de interações físico-químicas específicas ou não, formando microcolônias (se em condições ideais), se ligam às superfícies e em seguida colonizadores secundários se juntam às bactérias já aderidas aos dentes. Na sequência, ocorrem outras ligações na superfície, formando pontes para co-agregação de outras células microbianas, proporcionando dessa forma o desenvolvimento desse biofilme por múltiplas espécies^{30,31}. A produção aumentada da matriz extracelular (substâncias poliméricas no meio extracelular) ocorre durante o desenvolvimento do biofilme, e pode estar associada a adesão de colonizadores secundários. Estes polímeros envolvem as células dentro do biofilme, fortalecendo a

sua adesão, além de atuarem como receptores para interações de co-agregação³¹. Ainda ocorre comunicação metabólica, quando o metabólito produzido por um microrganismo servir de nutriente para outro, ou se a quebra de substrato por atividade extracelular enzimática propiciar substrato biológico para outro microrganismo. Portanto, durante essas interações, ocorre o processo de adesão seguido de colonização das superfícies dentárias e seus tecidos, que é o primeiro passo para a formação e estabilização do biofilme³⁰.

A construção do biofilme cariogênico é orquestrado pela espécie *S. mutans*, com a formação da MEC rica em EPS⁸, porém nem sempre esta espécie é a mais numerosa; e outros microrganismos são igualmente acidogênicos e acidúricos³². Assim, mesmo que *S. mutans* não seja um componente numeroso no biofilme, em situações propícias, como na presença de dieta rica em sacarose, essa espécie modula eventos no biofilme que o tornam patogênico (como mostra a Figura 1, e descrito no texto a seguir).

Figura 1 – Formação de biofilme



Interação dinâmica e complexa entre hospedeiro-microrganismo-dieta na etiologia e patogênese da cárie precoce da infância. Cárie precoce da infância (ECC), EPS (Exopolissacarídeos).

Fonte: Hajishengallis et al.¹, 2017^{p. 31}.

A sacarose da dieta serve como substrato enquanto os hidrolisados de amido funcionam como aceptores para a síntese de EPS (glicanos e frutanos) pelas exoenzimas de *S. mutans* Gtfs e frutotransferase (Ftf)⁸. Ainda, as Gtfs (*i.e.*, GtfB, GtfC, GtfD) secretadas por *S. mutans* são componentes da película salivar e sintetizam glicanos diretamente na superfície dentária promovendo a colonização por *S. mutans* e outros microrganismos. As Gtfs também se adsorvem na superfície de outros microrganismos orais convertendo os mesmos em produtores de glicano⁸. A GtfB e a GtfC produzem glicanos com ligações glicosídeas do tipo α -1-3, que são exopolissacarídeos insolúveis em água ou solúveis em álcali (ASP). Já a GtfC e a GtfD produzem α -1-6-glicanos que são exopolissacarídeos solúveis em água (WSP). Assim, dentre as Gtfs, GtfC produz tanto EPS solúvel quanto insolúvel. Ainda, entre WSP podemos encontrar frutanos (mas em baixa porcentagem), que são polímeros de frutose produzidos pela enzima Ftf²⁸.

Recentemente, foi demonstrada a importância da maneira pela qual a matriz EPS é construída tridimensionalmente e como o arranjo espacial de EPS com as células bacterianas cria microambientes com pH distintos (compartimentos, nichos), enquanto esta mesma organização da MEC confere proteção às bactérias contra agentes antimicrobianos (clorexidina) dentro de biofilmes com a arquitetura intacta¹¹. Crianças com ECC apresentam colonização por *S. mutans* chegando a 40% da microbiota cultivável³³⁻³⁸. Ainda, *C. albicans* também é frequentemente detectada em biofilmes de crianças com esse tipo de cárie¹²⁻¹⁵, por exemplo, um estudo isolou este fungo em 97% de lesões de cárie da infância¹². Na cavidade bucal, *C. albicans* é a principal espécie presente no fungoma oral e forma comunidades microbianas mistas sobre superfícies mucosas e protéticas³⁹, no entanto, quando há comprometimento do sistema imunológico pode causar doenças locais e sistêmicas sérias²¹.

Ainda, observações anteriores *in vitro*^{18,40-42} e *in vivo*²⁰ mostraram que interações entre *C. albicans* e *S. mutans* também ocorrem na superfície dentária na presença de sacarose. *C. albicans* induz a expressão de genes de *S. mutans* associados à EPS e à competência gênica (capacidade de incorporar outro DNA ao seu genoma)^{17,42}. Esse fungo é polimórfico e pode se apresentar em formas de levedura ou filamentar (tubos germinativos, pseudo-hifa, hifa); as mudanças morfológicas de *C. albicans* são importantes para a sua virulência. Na forma de levedura se dissemina facilmente pela corrente sanguínea, enquanto na forma filamentar se torna invasiva aos tecidos e importante para a colonização de órgãos⁴³.

Este fungo encontrado em crianças com ECC severa, muitas vezes é o mesmo encontrado nas mães sugerindo transmissão vertical²⁹. Ainda, existem relatos de forte correlação entre unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. mutans* e de *C. albicans* na saliva, sugerindo participação dos dois microrganismos na ocorrência de ECC¹⁵. Contudo, um único estudo sugere que *C. albicans* não apresenta características que tornem essa espécie cariogênica²¹. A seguir estão apresentados os estudos mais recentes e relevantes relacionados a virulência de biofilmes mistos e simples de *S. mutans* e de *C. albicans* (Quadro 1).

Quadro 1 – Principais achados em pesquisas anteriores em modelo de biofilme contendo *S. mutans* e *C. albicans* (continua)

Microrganismos e Cepas	Meio de Cultura e Carga Microbiana	Superfície para formação de biofilme	Análises	Tempo de análises	Principais Achados	Referências
Isolados de <i>Streptococcus mutans</i> (M1, M2, M3, M4, M5 e M6) Isolados de <i>Candida albicans</i> (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Gibbons e Nygaard Carga microbiana: Bactéria 2.1×10^9 UFC/mL; fungo 2.1×10^8 UFC/mL	Modelo in vitro: dentes humanos e superfícies de polietileno	Microscopia eletrônica de varredura Aderência em superfícies acrílica Viabilidade celular	48, 72 h	Isolados de <i>C. albicans</i> apresentaram morfologia filamentosa diferente do observado em Cepa padrão (aspecto menor); isolados de <i>S. mutans</i> apresentaram maior viabilidade celular comparando com a cepa padrão. Associação dos dois microrganismos favoreceu a adesão na superfície de polietileno, e sua organização estrutural foi mais volumosa. Intensidade de colonização de <i>S. mutans</i> foi mais extensa quando cultivado em associação com <i>C. albicans</i> (observado tanto em isolados quanto nas cepas padrão dos microrganismos).	Barbieri ⁴⁴ et al., 2007
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028; <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030; <i>Streptococcus mutans</i> UA159	Extrato de levedura suplementado com 18 mM de glicose ou 24,35 mM de sacarose Carga microbiana: bactéria 10^8 UFC/mL; fungo 10^7 UFC/mL	Modelo in vitro: discos HA, de polimetilmetacrilato e de material de revestimento suave para próteses totais ou “soft denture liner”	Viabilidade celular Microscopia confocal Microscopia eletrônica de varredura	24h	Discos de HA e de “soft denture liner”, apresentaram maior colonização microbiana no modelo sem película salivar formada. Houve maior UFC em biofilme crescidos em HA, independentemente da suplementação do meio (glicose ou sacarose) ou tipo e combinação de biofilmes. UFC de <i>C. albicans</i> e de <i>C. glabrata</i> foi maior em biofilme suplementado por glicose, porém UFC de biofilme misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> foi maior em todos os substratos testados, sugerindo a contribuição de <i>S. mutans</i> para o aumento de células fúngicas. Biofilmes de <i>Candida spp.</i> são afetados pela saliva, substrato e pela presença de outros microrganismos.	Pereira-Cenci ⁴⁰ et al., 2008
<i>Streptococcus mutans</i> UA159; <i>Candida albicans</i> SC5314	UFTYE + 1% de glicose Carga microbiana: bactéria 1×10^9 UFC/mL; fungo 1×10^8 UFC/mL	Modelo in vitro e in situ: bolinhas HA	Formação e síntese de glicanos Aderência de microrganismos Microscopia confocal e de fluorescência Susceptibilidade de EPS às enzimas mutanase e dextranase	1 e 2h	Presença de glicanos formados na superfície das células de <i>C. albicans</i> aumenta a ligação entre <i>S. mutans</i> e a levedura, favorecendo as interações bactéria-fungo no processo de formação de biofilme associado a ECC.	Gregoire ¹⁸ et al., 2011

Quadro 1 – Principais achados em pesquisas anteriores em modelo de biofilme contendo *S. mutans* e *C. albicans* (continuação)

<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> OMZ 1067	Água para beber + 2% de glicose e 2% de sacarose Carga microbiana: 10 ⁸ UFC/mL para as duas espécies microbianas	Estudo in vivo: modelo animal (ratos)	Escore de placa em superfícies lisas Escore de cárie em superfícies lisas Cárie de fissuras Microscopia confocal Microscopia eletrônica de varredura	23, 28 e 53 dias	A infecção com as 2 espécies na presença de sacarose, apresentou redução de células de <i>S. mutans</i> e aumento de células de <i>C. albicans</i> . Animais infectados com <i>C. albicans</i> , apresentaram lesões de fissuras mais avançadas. Ainda, microscopicamente observou-se presença <i>C. albicans</i> na forma de levedura e hifa incorporado no biofilme bacteriano e na colonização de fissuras oclusais e na dentina (penetrando os tubos dentinários), sugerindo potencial cariogênico para <i>C. albicans</i> .	Klinke et al. ⁴⁵ , 2011
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> SC5314	TYE+ 1% de sacarose. Água com 5% de sacarose e dieta cariogênica Carga microbiana: bactéria 2x10 ⁶ UFC/mL; Fungo 2x10 ⁴ UFC/mL	Estudo in vitro: discos HA; Estudo in vivo: modelo animal (ratos)	Quantitativa (Biovolume e UFC) Microscopia confocal Marcação de glicanos RT-qPCR (genes de <i>S. mutans</i> apenas) Escore de cárie	In vitro: 18, 22, 32 e 42h In vivo: 3 semanas	Biofilme misto revelou aumento da quantidade de MEC rica em EPS e consequente aumento no biovolume e UFC. No modelo animal observou-se instalação rápida de cárie em superfícies lisas e exposição de dentina em infecção por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> ; No modelo <i>in vitro</i> biofilmes mistos apresentaram expressão aumentada dos genes de <i>S. mutans</i> <i>gtfB</i> <i>gtfC</i> (construção da MEC), <i>dexA</i> e <i>gbpB</i> (remodelação ou degradação da MEC), <i>atpD</i> e <i>fabM</i> (tolerância ao estresse ácido), sugerindo que a associação bactéria-fungo pode influenciar na patogênese de ECC.	Falsetta et al. ²⁰ , 2014
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 ATCC 700610 cepa parental <i>Streptococcus mutans</i> UA159 SMP GFP (outras cepas mutantes) <i>Candida albicans</i> DSC11225	YNB + Sacarose (5g/L ⁻¹)	Modelo in vitro: fundo de placa de 96 poços.	UFC Biomassa Produção de substâncias poliméricas extracelulares Microscopia confocal Microscopia eletrônica de varredura qPCR (<i>SigX</i>) Micrografia eletrônica por scaneamento	4, 6, 8, 10, 12 e 24h	Em 10h houve expressão do gene <i>SigX</i> pelas duas espécies <i>S. mutans</i> quando em associação com <i>C. albicans</i> , e o mesmo não foi observado em biofilmes simples de <i>S. mutans</i> ; no entanto em 12h os biofilmes mistos com <i>S. mutans</i> GFP apresentaram diminuição da expressão desse gene. Ainda em 10h, observou-se a presença de matriz extracelular rica em exopolissacarídeos nos biofilmes simples das duas espécies microbianas (bactéria e fungo). Expressão aumentada de vários genes em biofilmes mistos <i>C. albicans</i> tem papel crucial no processo de progressão da cárie.	Sztajer et al. ⁴² , 2014
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> SC5314	TYE + 1% de sacarose Carga microbiana: bactéria 1x 10 ⁹ UFC/mL; fungo 1x10 ⁸ UFC/mL	Modelo in vitro: vidro revestido com poli-L-lisina	Atividade da enzima glicosiltransferase Microscopia de força atômica	1 e 2h	A força e estabilidade de ligação de GtfB é maior em superfícies de <i>C. albicans</i> vs <i>S. mutans</i> . Na presença de sacarose, Gtfs produz glicanos que propiciam ligações entre bactérias e superfícies dentárias; co-adesão com <i>C. albicans</i> e outros microrganismos importante para o início da formação de biofilme cariogênico.	Hwang et al. ¹⁹ , 2015

Quadro 1 – Principais achados em pesquisas anteriores em modelo de biofilme contendo *S. mutans* e *C. albicans* (continuação)

<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> SC5314	BHI + 10% de SFB + 0,2% de sacarose Carga microbiana: bactéria 1x 10 ⁹ UFC/mL; fungo 1x10 ⁸ UFC/mL	Modelo in vitro: discos HA ou lamínulas de vidro	pH do meio de cultura UFC Produção de ácido Quantificação de cálcio Microscopia confocal	24, 48 e 72h	Aumento de UFC em biofilmes maduros (72h); Maior produção de ácido láctico para biofilme misto vs simples. Biofilme misto apresentou maior perda de cálcio durante períodos de acidez do pH e menor perda de cálcio quando o pH estivesse próximo de neutro. O pH para as duas superfícies avaliadas (HA e lamínulas de vidro), não se apresentou diferente entre si para as 3 idades avaliadas; no entanto, biofilme misto apresentou pH mais ácido em 24h vs 72h.	Willemes et al. ²¹ , 2016
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> ATCC18804	BHI + 5% de sacarose YNB + 100mM de glicose Carga microbiana: bactéria (10 ⁴ , 10 ⁵ e 10 ⁷ UFC/mL, fungo 10 ⁶ e 10 ⁷ UFC/mL	Modelo in vitro: fundo de placa de 24 e de 96 poços e discos de resina acrílica Modelo in vivo: animal (<i>Galleria mellonella</i>)	Quantitativas (UFC e Biomassa do biofilme) Microscopia eletrônica de varredura Avaliação morfológica via microscopia óptica (filamentação por <i>C. albicans</i>) Curva de sobrevivência Análise histológica	0, 8, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168h	Modelo in vitro demonstrou que <i>S. mutans</i> favorece o crescimento de células de <i>C. albicans</i> ; na forma de filtrado de cultura microbiana observou-se redução da quantidade de células viáveis e do crescimento de <i>C. albicans</i> (quantidade reduzida de hifas) quando em associação com <i>S. mutans</i> , porém não houve redução da biomassa do biofilme de <i>C. albicans</i> . Maior quantidade de biomassa em biofilme misto, porém, para UFC/mL não houve diferença entre biofilme misto e simples de <i>S. mutans</i> . Modelo in vivo: injeção de células ou de filtrado de cultura de <i>S. mutans</i> em <i>G. mellonella</i> pré-infectadas por <i>C. albicans</i> propiciou maior sobrevida destes animais; no entanto, a quantidade de células na forma de hifa foi reduzida. Filtrado de cultura de <i>S. mutans</i> apresenta efeitos inibitórios na formação, morfogênese e patogenicidade de <i>C. albicans</i> , além de reduzir a candidíase em modelo animal.	Barbosa et al. ⁴⁶ , 2016
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> NGY152 ou CA14 (diversas cepas mutantes)	TYE+ 1% de sacarose Carga microbiana: bactéria 2x10 ⁶ UFC/mL; Fungo 2x10 ⁴ UFC/mL	Modelo in vitro: vidro revestido com poli-L-lisina; discos HA Modelo in vivo: animal (ratos)	Análises quantitativas (manoproteínas, carboidratos, biofilme e qPCR-DNA genômico) Microbiológicas Biofísicas e bioquímicas Microscopia eletrônica e varredura Microscopia confocal	18 e 42h, 3 semanas	Mananas localizadas na parede celular de <i>C. albicans</i> formam ligações fortes e estáveis com GtfB de <i>S. mutans</i> (importantes para a relação bactéria-fungo), porém para as cepas mutantes (que apresentam menor quantidade de mananas) observaram-se ligações fracas com GtfB. GtfB promove ligações com outras espécies microbianas, propiciando a formação de biofilmes multiespécie. Cepas mutantes (<i>efgΔΔ</i> e <i>bcr1ΔΔ</i>) apresentaram dificuldade na formação de hifa e de biofilmes simples.	Hwang et al. ⁴⁷ , 2017
<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Candida albicans</i> SC5314	TYE+ 1% de sacarose Carga microbiana: bactéria 2x10 ⁶ UFC/mL; Fungo 2x10 ⁴ UFC/mL	Modelo in vitro: Discos de HA	Sequenciamento de RNA Quantificação de carboidratos e de metabólitos Cromatografia	42h	Maior presença de genes relacionados com o transporte de carboidratos e processos metabólicos/catabólico. Presença de <i>C. albicans</i> e expressão de <i>S. mutans</i> em biofilmes mistos. Genes responsáveis pelas vias de metabolismo do piruvato (<i>pdhA</i> , <i>pdhB</i> , <i>pdhC</i> , <i>pdhD</i> , <i>adhE</i>), síntese de β-glicanos (<i>gtfB</i> e <i>gtfC</i>), foram melhor regulados em biofilme misto vs simples.	He et al. ⁴⁸ , 2017

Quadro 1 – Principais achados em pesquisas anteriores em modelo de biofilme contendo *S. mutans* e *C. albicans* (conclusão)

<i>Streptococcus mutans</i> UA159 <i>Streptococcus mutans</i> UA159 Green Fluorescent Protein (que expressa proteína verde) <i>Candida albicans</i> SC5314	TYE+ 1% de sacarose Carga microbiana: bactéria 2x10 ⁶ UFC/mL; Fungo 2x10 ⁴ UFC/mL	Modelo in vitro: discos HA	UFC Microscopia confocal Viabilidade celular Atividade das glicosiltransferases	6,18,22,28, 30 e 42h	Fatores extracelulares que ocorrem entre <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> estimulam o crescimento bacteriano com os biofilmes. Análises bioquímicas indicaram que farnesol pode ser um agente químico importante para a morfologia polimórfica de <i>C. albicans</i> (inibindo a transição levedura-hifa), além de apresentar atividade antibacteriana. Baixas concentrações de farnesol (25 µM) propiciam o crescimento de <i>S. mutans</i> e a expressão de <i>gtfB</i> ; no entanto altas concentrações (maiores que 100 µM) inibem esse processo. Ainda, a presença de <i>S. mutans</i> pode reduzir a produção de farnesol por <i>C. albicans</i> .	Kim et al. ¹⁷ , 2017
---	--	----------------------------	--	----------------------	---	---------------------------------

*TYE – triptona e extrato de levedura; BHI - do inglês “*brain heart infusion*” (infusão de coração cerebral); HA – Hidroxiapatita; SFB – soro fetal bovino.

Fonte: Elaboração própria.

Os microrganismos *C. albicans* e *S. mutans* desenvolvem uma interação simbiótica mediada pelas exoenzimas Gtfs produzidas por *S. mutans*, particularmente GtfB. GtfB se adere com avidéz excepcional à superfície de células de *C. albicans* no formato de levedura e de hifas¹⁹, produzindo quantidades elevadas de glicanos na superfície de *C. albicans* quando sacarose está disponível^{18,20}. Além disso, a presença de *C. albicans* em biofilmes mistos induz a expressão de genes *gtfs* de *S. mutans*. Esta interação única aumenta a capacidade de ambos organismos colonizarem as superfícies dentárias, aumentando a quantidade de EPS na matriz do biofilme, e sinergisticamente potencializando a virulência e a ocorrência de lesões de cárie agressiva (similares às lesões em ECC) em um modelo animal da doença¹⁹. Assim, os biofilmes cariogênicos in vitro formados por *S. mutans* e *C. albicans* diferem muito daqueles formados por *S. mutans* apenas, e sobretudo, a co-infecção de animais com ambos microrganismos resulta na formação de maior quantidade de lesões cariosas e com maior grau de severidade²⁰.

Biofilmes de *C. albicans* estão envoltos por matriz extracelular protetora, que lhe conferem resistência a antifúngicos comumente utilizados. Essa resistência pode ocorrer por (i) redução do metabolismo ou fisiologia específica das células do biofilme (crescimento lento); (ii) restrição a penetração dos antifúngicos pela matriz do biofilme; (iii) expressão de genes específicos por células do biofilme⁴⁹⁻⁵¹. *C. albicans* produz β -glicanos via várias glicosiltransferases (esses β -glicanos são polissacarídeos na parede celular e também EPS na matriz), principalmente com ligações β -1,3 e β -1,6 relacionados a resistência à antifúngicos^{52,53}. Além dos polissacarídeos da MEC do biofilme de *C. albicans*, eDNA também pode estar relacionado a proteção contra difusão de antifúngicos⁵⁴. A expressão do gene BGL2 está relacionada a formação de EPS na matriz e as funções do biofilme; PHR1 desempenha papel importante na estrutura da parede celular e na virulência de infecções relacionadas a pH baixo; SOD1 (superóxido dismutase citosólico de cobre e zinco) está envolvido na proteção contra estresse oxidativo e é importante para virulência total. A expressão aumentada de PHR2 pode ajudar a reforçar a proteção da parede celular⁵¹. Os genes BGL2, PHR1 (codificadores de glicosiltransferases) e XOG1 (β -1,3 exoglucanase) são responsáveis pela modificação e distribuição de carboidratos na matriz do biofilme maduro (sem este processo, os biofilmes tornam-se susceptíveis à intervenção de antifúngicos)⁵³.

Entretanto, não se conhece exatamente qual é a contribuição de substâncias poliméricas produzidas por *C. albicans* em biofilmes cariogênicos. Contudo, o uso de componentes da matriz de biofilme como barreira contra moléculas antimicrobianas parece ser preservado em biofilmes procarióticos e eucarióticos, e estratégias destinadas a prevenir a produção da matriz podem ter aplicações contra infecções causadas por biofilme⁵¹. No Quadro 2, estão descritos os genes de interesse para o presente estudo, alguns dos quais são importantes para a construção da MEC (tanto de *S. mutans*, quanto de *C. albicans*), e para a tolerância aos estresses ácido e oxidativo.

Quadro 2 - Genes selecionados para análise de expressão gênica.

Espécie	Gene de interesse	Descrição e Função
<i>S. mutans</i>	<i>16S rRNA</i>	Codifica rRNA* da menor subunidade ribossômica de eubactérias, utilizado como normalizador de expressão gênica de <i>S. mutans</i> ⁵⁵
	<i>atpD</i>	Codifica a subunidade AtpD da bomba de prótons F ₀ F ₁ -ATPase associada à tolerância ao estresse ácido ⁵⁶⁻⁵⁸
	<i>gtfB</i>	Codifica exoenzima GtfB responsável pela síntese de glicanos insolúveis, fundamentais para a construção da MEC ^{8,11}
	<i>nox1</i>	Tolerância ao estresse oxidativo ¹³
<i>C. albicans</i>	ATC1	Normalizador para quantificação relativa de <i>C. albicans</i> , construção da MEC ^{50,59}
	BGL2	Codifica a glicosiltransferase BGL2 (síntese de β-glicanos), envolvida na formação do biofilme, construção da MEC e proteção ^{53,54}
	PHR1	Codifica a glicosiltransferase PHR1 (síntese de β-glicanos), contribui para a tolerância ao estresse ácido e para a construção da MEC ^{53,60}
	PHR2	Tolerância ao estresse ácido, estrutura da parede celular e proteção contra antifúngicos ^{51,60}
	SOD1	Proteção contra estresse oxidativo e responsável pela virulência ^{51,59}

*rRNA- RNA ribossomal

Fonte: Elaboração própria.

3.4 Outros Fatores de Virulência

Ao sobreviver em vários locais da cavidade bucal, *S. mutans* é considerado como anaeróbio facultativo. O microrganismo em biofilme mantém-se aderido à estrutura dentária através dos produtos de fermentação da sacarose por *S. mutans*⁸.

Neste microrganismo o transporte de açúcares é feito por transportadores de membrana dependentes de ATP (ABC), translocadores de galactosida-pentose-hexuronida (GPH), e pelos sistemas fosfotransferase de açúcar do fosfoenolpiruvato (PTSs). Os PTSs são os principais transportadores de carboidratos de bactérias Gram-positivas, na sua maioria monossacarídeos, dissacarídeos, β -glicosídeos e álcoois de açúcar, e são responsáveis por formar ligações, transporte de transmembrana e fosforilação de inúmeros substratos de açúcar, além de regular processos metabólicos e transcricionais⁶¹.

A capacidade de *S. mutans* para transportar e metabolizar rapidamente açúcares disponíveis na dieta, pode estar relacionada à sua sobrevivência na placa dentária e seu potencial cariogênico em seres humanos⁶¹. *S. mutans* gera produtos ácidos por fermentação rápida de carboidratos (acidogenicidade), que além de provocarem desmineralização, afetam as condições ambientais influenciando o processo cariogênico. Ainda, *S. mutans* apresenta resposta adaptativa a tolerância ácida para combater a natureza destrutiva do ambiente ácido (aciduricidade) e é capaz de alterar sua atividade metabólica através do aumento da atividade glicolítica e síntese de aminoácidos durante o estresse ácido⁵⁸.

A saliva humana é saturada por cálcio, e este é o principal cátion na superfície dentária, podendo atuar como regulador responsável por respostas aos estresses e virulência de *S. mutans*. Para sobreviver à instabilidade de nutrientes, lidar com os efeitos prejudiciais dos metabólitos intermediários da via glicolítica, mantendo o equilíbrio entre NAD / NADH⁺, *S. mutans* apresenta abordagem regulatória sofisticada combinando regulação transcricional com modulação alostérica de atividades enzimáticas, garantindo assim o fluxo adequado de carboidratos^{56,62}. Observa-se ainda expressão dos genes *ahpF* e *nox1* em respostas ao estresse mediados por oxigênio (i.e., estresse oxidativo) e contribuindo para a eficiência do metabolismo de carboidratos. O catabolismo de nutrientes na saliva e a dieta do hospedeiro, criam ácidos que formam espécies reativas de oxigênio e agentes que quebram biomoléculas. Assim, a tolerância ao estresse oxidativo está relacionada à virulência dessa espécie⁵⁶.

Comparando o proteoma de biofilme maduro e de células planctônicas de *S. mutans* cultivadas em pH neutro, observou-se que proteínas múltiplas associadas à absorção de carbono e à divisão celular foram pouco reguladas, enquanto que proteínas necessárias para o desenvolvimento de competência genética foram

altamente reguladas⁵⁶. A produção coordenada de bacteriocinas por *S. mutans* e o desenvolvimento de competência é observada em ambientes de alta densidade celular, sugerindo que este, poderia usar a lise celular como competência induzida para adquirir DNA de espécies vizinhas^{56,61}. Ainda, a ingestão intermitente de alimentos pelo hospedeiro, resulta em mudanças de disponibilidade de nutrientes e de pH, além de variabilidade significativa nas tensões de oxigênio e osmolaridade. Contudo, em células “famintas” (que ficam muito tempo sem ter contato com nutrientes), pode ocorrer redução de pH e em simultâneo rápido aumento e diminuição de ATP, que resulta no aumentando da proteção contra a morte por ácidos.

Assim, o sistema F₀F₁-ATPase pode desempenhar papel tanto na tolerância ao ácido liberando prótons para fora das células e, como em certas condições, gerar ATP para o seu crescimento e persistência^{63,56}. O sistema F₀F₁-ATPase é importante para a sobrevivência de *Streptococcus* orais em ambientes ácidos. Em *S. mutans*, esse sistema é codificado por 6 genes (*atpC*, *atpD*, *atpG*, *atpA*, *atpH*, *atpF*), dentre os quais *atpD* é o que apresenta maior expressão e síntese, e por isso será alvo do presente estudo. Especificamente em biofilmes mistos, verifica-se a expressão aumentada do gene *atpD* no complexo ATPase, responsável pela conversão de ADP em ATP que ocorre principalmente em condições de baixo pH (por meio de trocas de membrana)⁵⁷.

Ainda, em condições de baixo pH, a membrana celular de *S. mutans* apresenta aumento de ácidos graxos mono-insaturados de cadeia longa (C_{18:1} e C_{20:1}) e ao mesmo tempo diminuição de ácidos graxos saturados de cadeia curta (C_{14:0} e C_{16:0})⁶⁴. Assim, alterações da membrana celular podem ocorrer como forma de sobrevivência bacteriana ao estresse ácido⁶⁵. No entanto, *S. mutans* dispõe de sistema análogo à arginina deaminase para o aumento do pH citoplasmático e produção de ATP e da fermentação malolática que faz a conversão do ácido L-málico (dicarboxílico) em ácido láctico monocarboxílico e CO₂^{61,66,67}. Verifica-se expressão aumentada de genes com capacidade de lidar com ambientes de estresse ácido como *atpD*, além de estar relacionado com o processo de formação do biofilme^{57,68,69}, ainda, existe expressão aumentada dos genes *gtfB* e *gtfC* quando *S. mutans* cresce sobre as superfícies, como resposta ao estresse ao ácido⁸.

C. albicans é um dos microrganismos aos quais as Gtfs se ligam e formam quantidades elevadas de EPS¹⁸. Portanto, a produção de EPS sintetizados in situ nas superfícies dentárias e microbianas permitem a adesão e acúmulo dos microrganismos nos dentes^{8,70-74}. Com o passar do tempo, esses EPS ajudam a

construir a matriz 3D que envolve e suporta as células, formando um ambiente altamente coesivo com difusão limitada, e nichos acídicos^{11,24,75}.

C. albicans também é ácido tolerante, pela presença de ATPase que bombeia prótons H^+ de dentro para fora da célula, se adere facilmente ao esmalte²¹, e se liga a *S. mutans* através das múltiplas adesinas presentes na parede celular da hifa (principalmente 1,3 e 1,6 β -glicanos). Ainda, *C. albicans* usa para seu metabolismo o ácido láctico produzido por *S. mutans* e reduz o oxigênio local por sua atividade respiratória, promovendo estimulação de fatores de crescimento bacteriano²⁸.

Assim, a criação de microambientes, delineados por uma matriz que limita a difusão, possui efeitos profundos na arquitetura, metabolismo e expressão da virulência do biofilme como um todo. Embora a causa imediata da dissolução do esmalte seja certamente a produção de ácido, a ausência do efeito da MEC do biofilme iria minimizar a capacidade de os ácidos causarem desmineralização na presença de saliva. A matriz rica em EPS insolúvel produzida por *S. mutans* é uma característica de virulência “particular” desta espécie que ajuda a separá-la das demais espécies acidogênicas e acidúricas²⁴. Porém, ainda é desconhecida qual é a exata contribuição de *C. albicans* na virulência de biofilmes cariogênicos. Este fungo é acidogênico e acidúrico⁷⁶, e produz MEC de composição variada, contendo eDNA, β glicanos, mananas, proteínas^{50,52,54,77}, e essa matriz tem sido associada à resistência contra antifúngicos^{53,78}. Ainda, a biogênese da matriz produzida por *C. albicans* é coordenada extracelularmente, refletindo ações cooperativas para a sua construção (quanto maior e diversificada for a comunidade microbiana, na presença de substrato, maior e mais rápida será a construção da MEC do biofilme)⁷⁸.

Estudos genômicos e proteômicos permitiram avanço na identificação de genes, proteínas e vias metabólicas associados à tolerância ao estresse por *S. mutans*, sendo que, alguns produtos de genes podem ser alvos atraentes para o desenvolvimento de novas terapias anti-cárie^{56,79}. Entretanto, estratégias para vias regulatórias utilizadas por *S. mutans* para detectar e gerar respostas aos sinais ambientais podem interromper o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos (como por exemplo, combinando a regulação transcricional com a modulação alostérica de atividades enzimáticas, para garantir o fluxo adequado de carboidratos)⁵⁶.

Portanto, o presente estudo in vitro caracterizou os mecanismos através dos quais a interação microbiana do biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans* poderiam influenciar na virulência desses biofilmes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Formação de Biofilmes in vitro

Cepas *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314, mantidas congeladas (freezer-80°C) foram reativadas em placas de ágar sangue e incubadas em estufa (LABOVEN, modelo L212) à 37°C e 5% CO₂, por 48h. Transferiram-se cinco colônias de cada cepa separadamente para meio de cultura líquido (triptona e extrato de levedura, pH 7,0, Difco™) suplementado com 1% glicose (37°C / 5% CO₂). Após incubação por 16 horas, essas culturas foram diluídas 1:20 no mesmo meio, e incubadas até atingirem densidade óptica (DO 600 nm) correspondente ao meio da fase exponencial de crescimento anteriormente determinada por curva de crescimento (*S. mutans* 0,710 ± 0,270 e *C. albicans* 0,970 ± 0,30)⁸⁰. Depois que atingiram a fase exponencial, os tubos contendo cada cepa foram centrifugados (20 min / 4000 rpm/ 4°C; Eppendorf, Centrifuge 5810R). O meio antigo foi descartado e substituído por novo meio de cultura líquido (triptona e extrato de levedura, pH 7,0, Difco™) suplementado com 1% sacarose, e a densidade óptica foi verificada novamente. Para os ensaios de formação de biofilme, essas culturas foram diluídas e obtiveram-se as concentrações microbianas de inóculo para *S. mutans* 2x10⁸ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e para *C. albicans* 2x10⁶ UFC/mL⁸⁰.

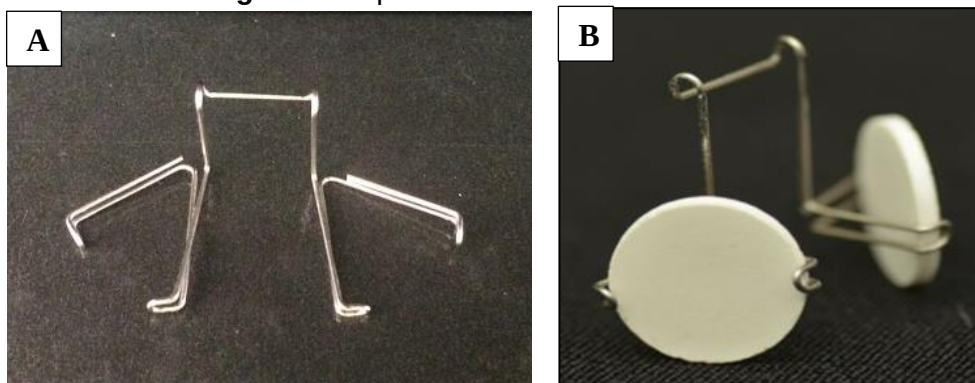
Utilizaram-se discos de hidroxiapatita (HA) como superfície para formação de biofilmes, por mimetizarem o esmalte dentário. Os discos de HA foram comprados prontos e possuíam uma área de superfície de 2,7 ± 0,2 cm² (Clarkson Chromatography Products, Inc., South Williamsport, PA).

Para formação de película adquirida utilizou-se saliva total estimulada e esterilizada por filtração (0,22 µm) (de acordo com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição Sede, CAAE: 55823016.7.0000.5416) (ANEXO), seguindo protocolo segundo Lemos et al.⁸¹, (2010). Especificamente, a saliva foi coletada por 3 doadores adultos em jejum no período da manhã. Certificou-se de que todos os doadores cumpriam as normas de inclusão para o estudo: ser saudável, não ter feito uso de antibióticos ou qualquer medicamento que alterasse o fluxo salivar nos últimos 3 meses, não ter passado por quimioterapia ou radioterapia, fazer uso de dentifrício contendo apenas flúor como princípio ativo na noite anterior e no dia da coleta, não ter sangramento durante a coleta. Antes de se iniciar a coleta foi preparado gelo que foi utilizado para conservação das amostras. Os doadores foram

orientados a fazer bochechos com água MilliQ e descartar em tubo falcon esterilizado. Os primeiros 5 mL de saliva coletados eram descartados, e em seguida, utilizava-se novo tubo falcon para coleta de saliva. Por coleta, eram doados +/-100 mL de saliva por doador. Após coleta, toda a saliva foi diluída com tampão tampão de absorção (Tampão AB: 0,05 M KCl; 0,02 M KPO₄; 0,02 M CaCl₂; 0,02 M MgCl₂) na proporção 1/1, seguiu-se a adição de fluoreto de fenilmetilsulfonil (*phenylmethylsulfonyl fluoride* – PSMF, Sigma) (inibidor de proteases) na proporção 1/1000 e os tubos foram centrifugados (20 min / 4000 rpm / 4°C; Centrífuga Eppendorf 5810). Depois de centrifugada, a saliva clarificada (o sobrenadante) foi esterilizada por filtração (filtro de membrana de polietersulfona com baixa ligação de proteína, 0,22 µm), e preparada para experimento ou conservada em freezer -80°.

Para o experimento, foram preparados biofilmes simples de *S. mutans* e de *C. albicans* e biofilme misto das duas espécies utilizando um n=16. Os discos de HA foram posicionados verticalmente em placas de 24 poços com auxílio de aparato confeccionado com fio ortodôntico (Figura 2), a fim de evitar efeito de depósitos microbianos devido à gravidade.

Figura 2 – Aparato confeccionado com fio ortodôntico.



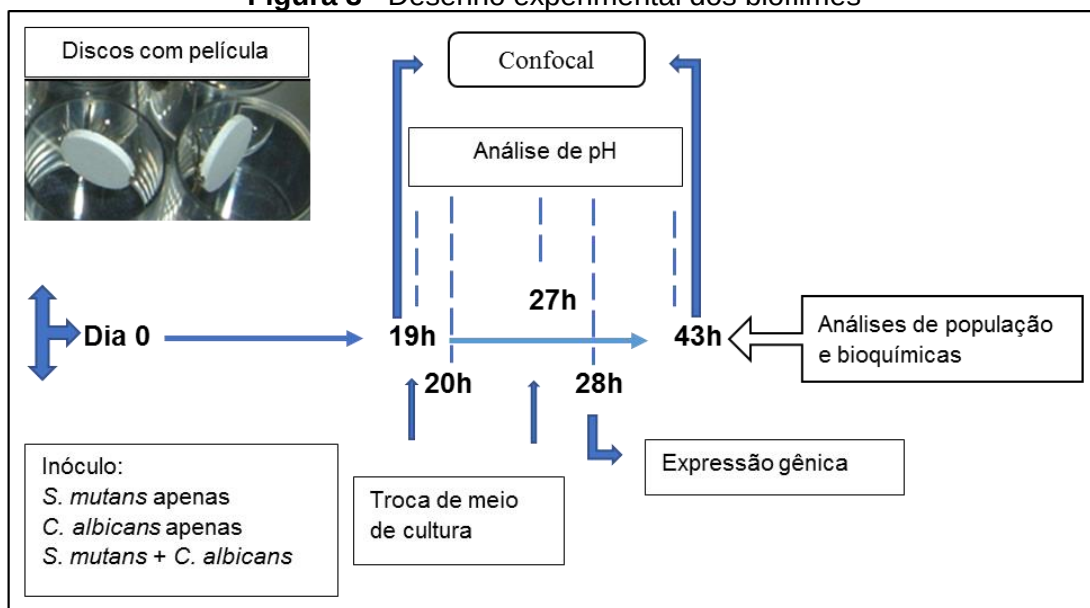
A: aparato confeccionado por fio ortodôntico para suporte dos discos de Hidroxiapatita (HA);
 B: discos de hidroxiapatita posicionados no aparato.
 Fonte: Elaboração própria

O modelo de biofilme misto mimetiza o biofilme cariogênico relacionado ao desenvolvimento de lesões cariosas severas (como visto na cárie precoce da infância²⁰) e também mimetiza biofilmes encontrados em próteses acrílicas e outras superfícies⁴⁰. Assim, para a formação da película salivar, os discos esterilizados foram hidratados em água MilliQ esterilizada (20 min, temperatura ambiente) e transferidos para poços contendo 2,8 mL da saliva preparada e esterilizada. Os discos foram

incubados durante 1 hora, 75 rpm, 37°C e após esse período, estava formada a película salivar. Na sequência, os discos foram enxaguados em tampão AB e transferidos para poços com 2,8 mL de inóculo para a formação dos biofilmes.

O inóculo foi utilizado para formação dos biofilmes formados pelas cepas de *S. mutans* UA159 (2×10^8 UFC/mL) e *C. albicans* SC5314 (2×10^6 UFC/mL). Biofilmes de espécies simples de *S. mutans* (2×10^8 UFC/mL) e de *C. albicans* (2×10^6 UFC/mL) foram utilizadas como controles. Os biofilmes foram inoculados no meio de cultura líquido (triptona e extrato de levedura, pH 7,0), contendo 1% de sacarose, incubados à 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura (triptona e extrato de levedura, pH 7,0, com 1% de sacarose) foi trocado duas vezes ao dia, quando os biofilmes atingiram idades de 19 e 27h, para simular as mudanças de pH que ocorrem na cavidade bucal. Após as trocas de meio, utilizou-se o meio velho para checar o pH (pHmetro - modelo QX 1500 Plus). Além da aferição de pH após as trocas de meio (19 e 27h), foram realizadas outras aferições nas idades em que os biofilmes foram removidos para análises: 20 e 28h para expressão gênica e 43h para análises bioquímicas (colorimétricas) e de população microbiana, bem como da arquitetura 3D via microscopia confocal (verificada também em 19h) (Figura 3). As análises foram realizadas em 20 e 28h para que não houvesse interferência do pH do meio nos dados obtidos.

Figura 3 - Desenho experimental dos biofilmes



Fonte: Elaboração própria

4.2 Análises dos Biofilmes

4.2.1 Análises bioquímicas (colorimétricas) e método microbiológico

Em 43h, os biofilmes foram removidos e analisados utilizando métodos padrão de análises bioquímicas (colorimétricas) e método microbiológico de cultivo microbiano. Estes métodos foram usados para determinar o peso seco do biofilme (biomassa), conteúdo total de proteínas, e quantificação de exopolissacarídeos (solúveis e insolúveis em água – WSP e ASP, respectivamente) e verificar a quantidade de células viáveis via unidades formadoras de colônias (UFC)^{82,57}.

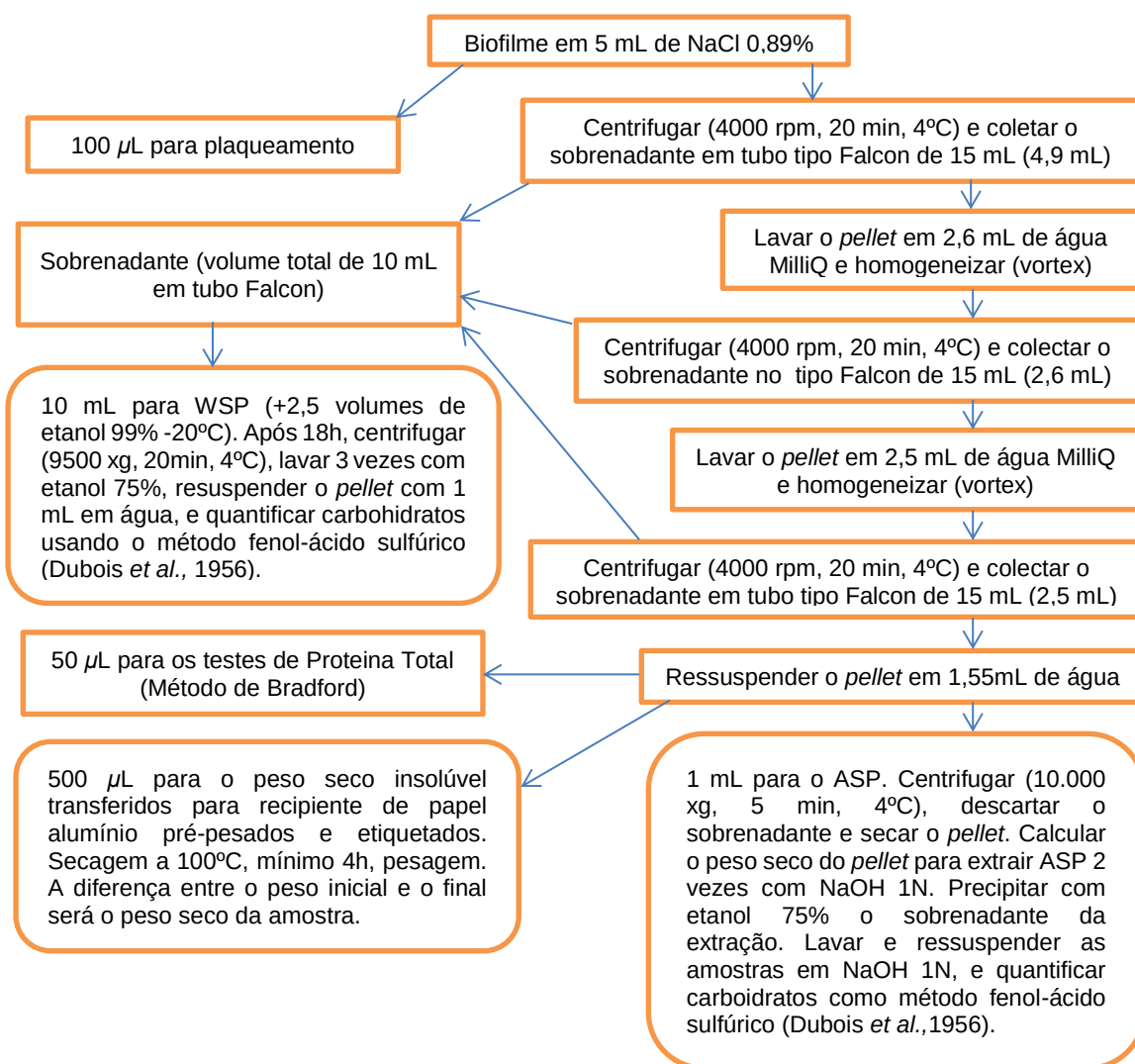
Para tanto, os biofilmes foram lavados 3 vezes com NaCl 0,89% esterilizado, e os discos de HA foram retirados de cada aparato da placa com o auxílio de uma pinça, e transferidos para tubo de vidro contendo 2 mL de NaCl 0,89%. Os tubos com os discos foram colocados em um béquer contendo água MilliQ esterilizada e sonicados por 10 min (em banho ultrassônico – marca Kodortech, modelo C-D-4820), para remoção dos biofilmes dos discos. Para remoção do biofilme residual os discos foram raspados com o auxílio de espátulas de aço inoxidável esterilizadas. A suspensão de cada biofilme foi transferida para novo tubo tipo falcon de 15 mL, e os tubos de vidro foram lavados com 3 mL de NaCl 0,89%, os quais também foram transferidos para o tubo falcon correspondente a cada amostra, totalizando 5 mL da suspensão de biofilme. A suspensão foi homogeneizada com sonda por 30 segundos à 7 watts (Sonicador modelo Q125, QSonica) e processada.

Do volume de 5 mL, 0,1 mL, foram separados para diluição seriada e plaqueamento (semeadura em placa de ágar sangue), seguida de incubação por 48h à 37°C e 5% de CO₂, para contagem de UFC. O volume remanescente (4,9 mL) foi centrifugado a 4000 rpm, por 20 min (4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado em outro tubo (falcon de 15 mL) e o *pellet* (precipitado celular com os componentes insolúveis da MEC) foi lavado com 2,6 mL de água MilliQ (4000 rpm / 20 min / 4°C). Após centrifugação, o sobrenadante foi misturado no mesmo tubo falcon de 15 mL (que já continha sobrenadante). Repetiu-se a lavagem com mais 2,5 mL de água que foi novamente armazenado (totalizando 10 mL de sobrenadante). Os sobrenadantes armazenados (10 mL) foram utilizados para os testes de polissacarídeos solúveis em água (WSP). O *pellet* foi ressuspenso em 1,55 mL de água, dos quais 0,5 mL foram utilizados para cálculo do peso seco, 0,05 mL para quantificação de proteínas totais

(Método de Bradford), e 1 mL foi usado para a determinação de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água (solúveis em álcali – ASP)⁷.

Para análise do peso seco do biofilme, os 0,5 mL foram transferidos para recipientes de papel alumínio pré-pesados e etiquetados. Os recipientes de papel alumínio contendo as amostras de peso seco (0,5 mL) foram secados à 100°C por no mínimo 4h e realizou-se nova pesagem. A diferença entre o peso inicial dos recipientes de alumínio sem e com amostra de peso seco (0,5 mL da suspensão do biofilme em 5 mL de NaCl 0,89% para biomassa total) resultou no peso seco da amostra⁷ (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma para processamento dos biofilmes



Fluxograma para processamento dos biofilmes para análises da população microbiana e bioquímicas.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Organização estrutural tridimensional do biofilme via microscopia confocal de varredura a laser

Inicialmente foi feita a marcação geral dos biofilmes misto e simples de *S. mutans* e *C. albicans* (43h de crescimento) para análise das microcolônias e EPS produzido por *S. mutans* (Alexa Flúor 647). Para tanto, foram utilizados 2 discos de HA para cada tipo de biofilme e realizadas 4 ocasiões experimentais sendo obtidas pelo menos 3 imagens por disco (imagens representativas do biofilme). A microscopia dos componentes da matriz em biofilmes intactos foi conduzida usando um método baseado na incorporação de 10 kDa dextranos marcados (fluorescentes) pelas enzimas Gtfs durante a formação de exopolissacarídeos (glicanos)⁸³. Os biofilmes mistos e simples de *S. mutans* UA159 e de *C. albicans* SC5314 foram formados sobre os discos de HA com película, em meio de cultura com 1% de sacarose (37°C / 5% CO₂), como descritos acima. Para a visualização da matriz dos biofilmes, dextranos marcados com fluoróforo Alexa Flúor 647 (emissão de fluorescência máxima de 647/668 nm; Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) foram incorporados pelas enzimas glicosiltransferases de *S. mutans* durante a formação de exopolissacarídeos. Para tanto, 13,4 µL desses dextranos à 1 mM foram adicionados ao meio de cultura (2,8 mL) desde o início de crescimento dos biofilmes. As células microbianas foram evidenciadas com fluoróforo SYTO9 (485/498 nm; Molecular Probes) após os biofilmes completarem 43h. Os biofilmes foram transferidos para poços contendo 1,5 µL de SYTO9 e 2,8 mL de solução NaCl 0,89%, e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Esses biofilmes foram enxaguados em solução NaCl 0,89% e transferidos para placas de petri com fundo em lamínula contendo solução NaCl 0,89% para a aquisição das imagens. As imagens foram adquiridas com um microscópio de fluorescência confocal (CARLS ZEISS LSM 800 com Airyscan com detector GaAsp, lasers 488 nm e 561 nm com objetiva de 20x; Alemanha), com configuração 1024x1024, em incrementos de 1,5 µm e analisadas usando o software ZEN Blue 2.3 (para reconstrução 3D).

Ainda, para refinar a análise das relações entre as células microbianas (bactéria e fungo), seus componentes estruturais e localização na superfície de HA, além da marcação de polissacarídeos produzidos por *C. albicans*, foram formados biofilmes mistos e simples de 19h. A cepa de *S. mutans* UA159 utilizada expressa proteína verde fluorescente (GFP)²⁰. Para marcação de polissacarídeos produzidos por *C.*

albicans, foram selecionados 3 anticorpos primários específicos para os polissacarídeos produzidos pelo fungo [1,3 β -glicano (400-2); 1,3 e 1,4 β -glicano (400-3); 1,4 β -manana e galacto 1,4- β (400-4)] (Biosupplies, Austrália). Nesta etapa, foram realizadas 3 ocasiões distintas, sendo utilizados 2 discos para formação de biofilme simples de *S. mutans* UA159 GFP, 4 discos para formação de biofilme misto e 4 discos simples de *C. albicans* (1 disco por anticorpo e 1 disco controle). A formação destes biofilmes seguiu a metodologia acima descrita com a marcação da matriz EPS de *S. mutans* com Alexa Flúor 647. Em 19h de crescimento, os discos com os biofilmes foram transferidos individualmente para placas de petri com fundo em lamínula contendo solução NaCl 0,89% e em cada biofilme foram adicionados 150 μ L do anticorpo primário selecionado (400-2 ou 400-3 ou 400-4) diluído em solução de albumina de soro bovino (ASB) a 2% e Tripton X100 a 0,1% (diluição 1:20) e incubados por 18h (4°C). Após essa incubação, os biofilmes foram lavados cuidadosamente com solução de NaCl 0,89% e foi adicionada solução de bloqueio [solução salina tamponada com fosfato-PBS 1X (pH 7.3: 50 mM de PBS 1x, 200 mM / 11.68 g NaCl, 6.89 g H₂NaO₄P.H₂O, 7.09 g Na₂HPO₄ pH 7,3) + 3% de ASB] seguida de incubação por 15 min (4°C); os biofilmes foram lavados novamente com solução de NaCl 0,89% e adicionou-se o anticorpo secundário marcado com fluoróforo Alexa Flúor 405 [(401/421 nm); Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 405) (ab175660), Abcam]] (diluição 1:500 em PBS) seguido de incubação por 2h (4°C). Passado o tempo de incubação do anticorpo secundário, os biofilmes foram lavados com NaCl 0,89% e incubados por 30 min com 80 μ g/mL de lectina concavalina A conjugada com o fluoróforo tetrametilrodamina (laser 555/580 nm)²⁰ (Falsetta et al., 2014) e NaCl 0,89%; seguiu-se a lavagem dos biofilmes com NaCl 0,89% e estavam prontos para a aquisição das imagens. As imagens foram adquiridas utilizando o mesmo microscópio de fluorescência confocal na mesma configuração descrita acima, porém com a objetiva de 63x (imersão em óleo) e incrementos de 0,5 μ m (biofilmes simples) e 1,0 μ m (biofilmes mistos). Para esta análise, selecionou-se um biofilme de 19h por ser menos espesso do que o biofilme de 43h, permitindo a penetração do laser; a escolha da objetiva de maior ampliação facilitou a verificação de todas as marcações com maior especificidade (principalmente EPS de *S. mutans*, polissacarídeos produzidos por *C. albicans* e a localização dos microrganismos na MEC e sobre os discos de HA).

4.2.3 Expressão gênica de *S. mutans* e de *C. albicans*

A metodologia RT-qPCR (*reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) incluiu o isolamento de RNA, a síntese de cDNA e a análise da expressão gênica via qPCR; ainda, foram utilizados 4 genes específicos de *S. mutans* e 5 genes específicos de *C. albicans*, para avaliar o perfil de expressão como descrito a seguir: Para *S. mutans*, foi monitorada a expressão dos genes associados com a síntese de EPS (*gtfB*). Mudanças dinâmicas na expressão desses genes podem afetar a composição e a estrutura bioquímica de exopolissacarídeos, os locais para adesão microbiana, e a integridade física da matriz, influenciando a formação de microambientes dentro do biofilme⁸. Também foi examinado o perfil de expressão de genes associados a tolerância aos estresses ácido (*atpD*) e oxidativo (*nox1*), pois esses genes possuem papel no crescimento e sobrevivência de *S. mutans*, e são particularmente induzidos em biofilmes in vitro⁵⁷.

Para *C. albicans*, foi avaliada a expressão de genes que possam contribuir para a formação de biofilme virulento no contexto de interações entre reinos (bactéria-fungo - Quadro 3). Além disso, foi avaliada a expressão de duas transferases de glicano (BGL2, PHR1); pois, o controle da expressão desses genes está relacionado com a construção da MEC por *C. albicans*. A expressão dos genes associados com à tolerância ao estresse ácido (PHR1- também relacionado com a MEC, e PHR2), é altamente dependente do pH, e tem função na morfogênese levedura-hifa, bem como na adaptação ao pH extracelular^{60,84}. PHR1 é expresso em pH acima de 5.5, enquanto PHR2 é induzido em pH menor que 5, mas não é expresso em pH acima de 6.0⁶⁰. Ainda, foi avaliada a expressão de gene de tolerância ao estresse oxidativo (SOD1)⁵⁹.

Os biofilmes mistos e simples de *S. mutans* UA159 e de *C. albicans* SC5314 foram formados sobre discos de hidroxiapatita com película, em meio de cultura com 1% de sacarose (37°C / 5% CO₂), como descritos acima. Estes foram processados para isolamento de RNA em duas idades de biofilmes: 20 e 28h (1h após a troca de meio realizada quando os biofilmes atingiram 19 ou 27h), e os experimentos foram realizados com 28h (maior rendimento e pH similar ao de 20h). Ainda, as análises foram realizadas nestas fases para que não houvesse diferença no pH do meio de cultura dos biofilmes, o que poderia influenciar no perfil de expressão gênica. Contudo, mesmo com a utilização de biofilmes de 28h, *C. albicans* apresentou baixo rendimento (quantidade) de RNA; portanto realizou-se de diversos experimentos para obtenção de quantidade suficiente para síntese de cDNA (0,5 µg de RNA total por cDNA).

Quadro 3 - Primers para realização de RT-qPCR.

Microrganismo	Nome do Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (<i>forward</i> e <i>reverse</i>)	T_m (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referências
<i>S. mutans</i>	<i>16S rRNA</i> (normalizador)	ACCAGAAAGGGACGGCTAAC TAGCCTTTTACTCCAGACTTTCCTG	58	122	Xiao et al. ¹¹ , 2012
	<i>gtfB</i>	AAACAACCGAAGCTGATAC CAATTTCTTTTACATTGGGAAG	58	90	
	<i>nox1</i>	GGACAAGAATCTGGTGTTGA CAATATCAGTCTCTACCTTAGGC	58	91	Feng et al. ⁸⁵ , 2014
	<i>atpD</i>	GGCGACAAGTCTCAAAGAATTG AACCATCAGTTGACTCCATAGC	58	115	Klein et al. ⁵⁷ , 2012
<i>C. albicans</i>	ACT1 (normalizador)	ATTCGGTGAGTAATCCTA GTATAGTCCAGATAACAACA	55	167	Alonso et al. ⁸⁶ , 2018
	BGL2	ATGGGTGATTTGGCTTTCAA CAGCTGGACCAAGGTTTTGT	62	163	Srikantha et al. ⁸⁷ , 2013
	PHR1	GGTTTGGTTCTGGTTGATGG AGCAGCAGTTCCTGGACATT	62	156	
	PHR2	CTCCTCCATTTCCAGAACCA CGTCTGAATCAACCTTGTCG	62	146	
	SOD1	TTGAACAAGAATCCGAATCC AGCCAATGACACCACAAGCAG	60	396	Zhu et al. ⁵⁹ , 2011

Fonte: Elaboração própria.

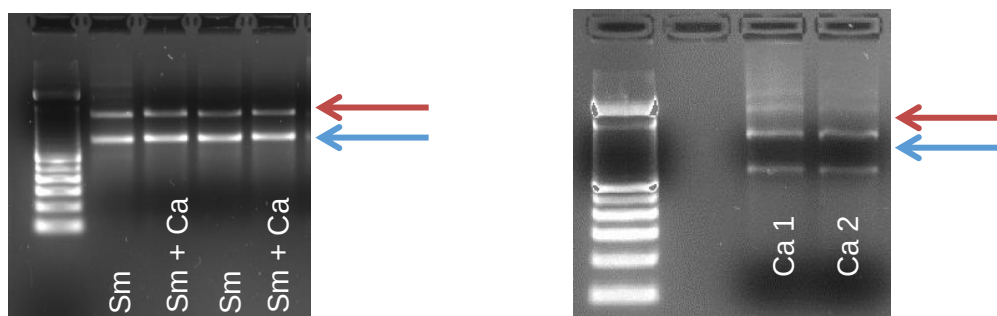
4.2.3.1 Isolamento de RNA

Após 28h de formação dos biofilmes, o RNA foi isolado (extraído e purificado) conforme metodologia otimizada para biofilmes⁸⁸, com algumas modificações (tempo de bead-beater foi aumentado de 40 segundos para 1 min). Os biofilmes foram removidos do meio de cultura, lavados com solução salina (0,89% NaCl) e cada disco com biofilme foi dispensado em tubo de vidro contendo 1 mL de RNAlater (Ambion - Molecular Probes). Em seguida, com o auxílio de pipetador/ponteira 1,5 mL de RNAlater foi dispensado nas paredes do tubo de vidro para o aproveitamento completo da amostra de biofilme, incluindo partículas que pudessem estar nas paredes do tubo, fossem cobertas com RNAlater. Os tubos de vidro contendo os discos com biofilmes, foram fechados, e transferidos para Béquer contendo água destilada (4°C), e submetidos à sonicação em banho ultrassônico por 10 min, mantendo a temperatura da água até no máximo 25°C (para evitar degradação de RNA). Depois, com o auxílio de uma espátula (limpa e esterilizada), removeu-se por raspagem, todo o remanescente de biofilme dos discos. A suspensão de biofilme resultante foi transferida para tubo tipo falcon de 15 mL e foi feita uma última lavagem dos tubos de vidro (1 mL de RNAlater) para remoção de possíveis remanescentes de biofilme e o mesmo passou por todos os tubos de cada tipo de biofilme, sendo no final adicionado ao tubo falcon de 15 mL inicial. As amostras foram conservadas em freezer -80, até o momento de extração.

A extração de RNA foi feita usando o método de separação fenol-clorofórmio, e a purificação foi via tratamento com DNase na coluna (Qiagen) e em solução (TURBO DNase; Ambion), descrito detalhadamente por Cury e Koo⁸⁸ (2007), com modificação no tempo utilizado para ruptura das células por bead-beater (5 repetições de 1 min cada). A DNase foi removida usando o RNeasy MinElute clean-up kit (Qiagen). Determinou-se a integridade do RNA purificado por eletroforese de gel de agarose 1% (Ultra Pure™ Invitrogen, Figura 5). Espectrofotometria foi utilizada para avaliar a quantidade (DO 260 nm) e a pureza (razão DO 260/280) do RNA total (Nano-espectrofotômetro DS-11+, Denovix).

Biofilmes misto (2 discos) e simples de *S. mutans* (4 discos) foram formados em pelo menos 3 ocasiões, no entanto, para *C. albicans*, foram necessários mais discos (24) de pelo menos 3 ocasiões experimentais.

Figura 5 – Amostras de RNA após eletroforese em gel de agarose.



Imagens representativas de amostras de RNA total após eletroforese em gel de agarose a 1%: Observou-se integridade do material genético, bandas correspondentes às subunidades 16S rRNA (seta azul) e 23S rRNA (seta vermelha) para *S. mutans*; e 18S rRNA (seta azul) e 28S rRNA (seta vermelha) para *C. albicans*, para as amostras apresentadas: Sm (*S. mutans*) Sm + Ca (*S. mutans* e *C. albicans*) e Ca (*C. albicans*). A primeira canaleta de cada imagem contém um padrão de peso molecular 100bp DNA ladder (Invitrogen).

Fonte: Elaboração própria.

4.2.3.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado usando o kit iScript (BioRad). Para síntese de cDNA, 0,5 μ g de RNA total foi misturado com 4 μ L do tampão 5X iScript, 1 μ L da enzima transcriptase reversa, e água de grau molecular *q.s.p.* para completar 20 μ L (*i.e.*, amostras com enzima transcriptase reversa, +RT). Reações contendo todos os reagentes do kit, exceto a transcriptase reversa foram os controles negativos, e serviram para determinar a presença de contaminação com DNA (*i.e.*, amostras –RT). As reações foram incubadas usando o termociclador CFX96 (BioRad), seguindo o seguinte ciclo: 25°C / 5 min, 42°C / 30 min, 85°C / 5 min, finalizado com 4°C. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o uso para quantificação da expressão gênica (qPCR).

4.2.3.3 Quantificação da expressão gênica utilizando RT-qPCR

O cDNA (sintetizado como descrito no item “Síntese de cDNA”) foi amplificado com *primers* específicos seguindo protocolos padronizados^{57,83,89,90}. Para o qPCR, 5 μ L de cDNA foram amplificados com X μ L de *primers* específicos (10 μ M, *forward* e *reverse* – Tabela 4; volume dependente da concentração ótima determinada experimentalmente ou anteriormente, conforme as diretrizes para qPCR⁹¹) e 12,5 μ L de 2X SYBR Green Supermix (BioRad), e água de grau molecular até completar 25 μ L. Para cada *primer* (Quadro 4) foram realizadas reações referentes ao respectivo

ciclo no equipamento CFX96 (BioRad) e foi feita a curva padrão baseada no produto de PCR (para cada *primer*) como descrito anteriormente⁹², e resulta em $R^2 \cong 1$; eficiência de reação de 90-100%; *slope* de $\cong -3.3$. A expressão relativa dos genes de *S. mutans* foi calculada através da normalização de cada gene de interesse pelo gene 16S rRNA de *S. mutans*. No entanto, os genes de interesse de *C. albicans* não foram normalizados pelo gene ACT1 por este não apresentar o mesmo perfil de expressão nos dois biofilmes, como se espera que o gene normalizador se comporte.

Quadro 4 - Reações para cálculo de concentração ótima dos genes BGL2, PHR1 e PHR2.

	200 η M	250 η M	300 η M	350 η M	400 η M	450 η M
DNA template	0,5 μ L	0,5 μ L	0,5 μ L	0,5 μ L	0,5 μ L	0,5 μ L
2x SYBR Green	12,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L
10 μ M primer	0,5 μ L	0,625 μ L	0,75 μ L	0,875 μ L	1 μ L	1,125 μ L
Água	11,5 μ L	11,375 μ L	11,25 μ L	11,125 μ L	11 μ L	10,875 μ L
Total	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L

Fonte: Elaboração própria.

Para os genes BGL2, PHR1 e PHR2, foi determinada a concentração ótima utilizando qPCR, com SYBR green e DNA genômico de *C. albicans* (10 η g/ μ L), utilizando-se como concentrações de *primers*: 200, 250, 300, 350, 400 e 450 η M (Quadro 5). Para cada concentração fez-se um Master Mix específico, e correu-se o ciclo de qPCR para todas. Considera-se concentração ótima aquela que apresentar menor ciclo de quantificação (Cq) comparada as outras concentrações do ciclo para o mesmo *primer*. Sendo assim, para os genes BGL2, PHR1 e PHR2 foram realizados testes e determinou-se concentração ótima de 350 η M. As concentrações ótimas dos genes 16S rRNA (200 η M) e *gtfB*, *atpD* e *nox1* (250 η M) foram padronizadas anteriormente^{85,57,11}. As concentrações para os *primers* de *C. albicans* ACT1 (350 η M) e SOD1 (400 η M) também foram pré-estabelecidas⁸⁶.

Quadro 5 – Sequência do ciclo de qPCR para cada *primer*

Primers	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4	Passo 5	Passo 6
16S <i>rRNA</i> <i>atpD</i> <i>gtfB</i> <i>nox1</i>	95 °C / 3:00 min	94 °C / 0:15 min	58 °C / 0:30 min	68 °C / 0:30 min	Voltar ao passo 2 (39X)	Melt curve 65–95 °C; aumentar 0,5 °C / 0:05 min
ACT1	95 °C / 10:00 min	94 °C / 0:15 min	55 °C / 0:30 min	68 °C / 0:15 min	Voltar ao passo 2 (39X)	Melt curve 55–95°C; aumentar 0,5 °C / 0:05 min
BGL2 PHR1 PHR2	95 °C / 10:00 min	94 °C / 0:15 min	62 °C / 0:30 min	68 °C / 0:30 min	Voltar ao passo 2 (39X)	Melt curve 55–95°C; aumentar 0,5 °C / 0:05 min
SOD1	95 °C / 10:00 min	94 °C / 0:15 min	60 °C / 0:30 min	68 °C / 0:30 min	Voltar ao passo 2 (39X)	Melt curve 55–95°C; aumentar 0,5 °C / 0:05 min

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística descritiva e inferencial, para verificação de diferenças entre os produtos de biofilme. O estudo teve n=12 (sendo 4 por tipo de biofilme: simples de *S. mutans*, simples de *C. albicans* e misto), e foram realizadas 3 ocasiões por grupo. Os dados foram organizados em banco de dados (planilhas de excel) e analisados com o auxílio de tratamentos estatísticos adequados de acordo com a distribuição. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para análise da distribuição dos dados. Quando os dados apresentavam distribuição normal, foi utilizado um teste paramétrico: a ANOVA um critério ou dois critérios (para mais de dois grupos, com pós-teste de Tukey) ou o teste t não pareado com correção de Welch (para dois grupos). Quando os dados não apresentavam distribuição normal, foi utilizado um teste não-paramétrico: o teste Kruskal-Wallis (para mais de dois grupos, com pós-teste de Dunn) ou o teste Mann Whitney (para dois grupos). Testes de comparações múltiplas foram feitos quando o teste principal rejeitou a hipótese nula. Ainda, fez-se a análise descritiva e qualitativa das imagens da microscopia confocal. Para analisar os resultados, utilizou-se o software estatístico Prism 7 (GraphPad Software, Inc., 2016). O nível de significância foi 0,05.

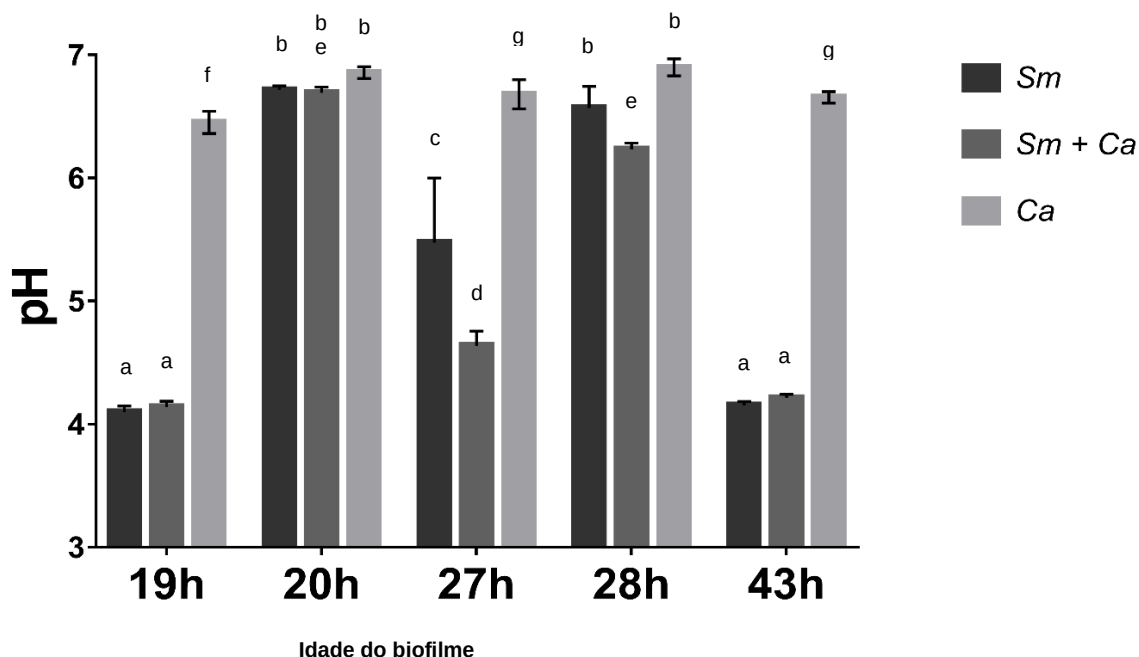
5 RESULTADOS

5.1 pH do Meio de Cultura

O pH do meio antigo foi aferido após as trocas de meio de cultura (19 e 27h) e quando os biofilmes foram removidos para o processamento em 19h (microscópica), 20 e 28h (análise de expressão gênica) e 43h (análises de população, bioquímicas e microscopia). Os dados de pH estão representados na Figura 6, $n=12$ (4 replicatas de 3 ocasiões experimentais) e observou-se diferença estatística significativa entre os três biofilmes e entre as idades ($p<0,001$; ANOVA a dois critérios).

Os valores médios de pH foram mais ácidos em 19 e 43h comparados à 27h para os biofilmes simples de *S. mutans* e misto; essa diferença entre períodos é estatisticamente significativa ($p<0,001$; ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey). Biofilmes simples de *S. mutans* e misto apresentaram comportamento similar em 19 e 43 h ($p=0,730$ e $p=0,665$). Para o biofilme simples de *C. albicans*, os valores de pH mantiveram-se próximos a neutralidade em todas as idades ($p<0,001$; ANOVA a dois critérios, seguido do teste de Tukey).

Figura 6 - Dados de pH do meio de cultura dos biofilmes



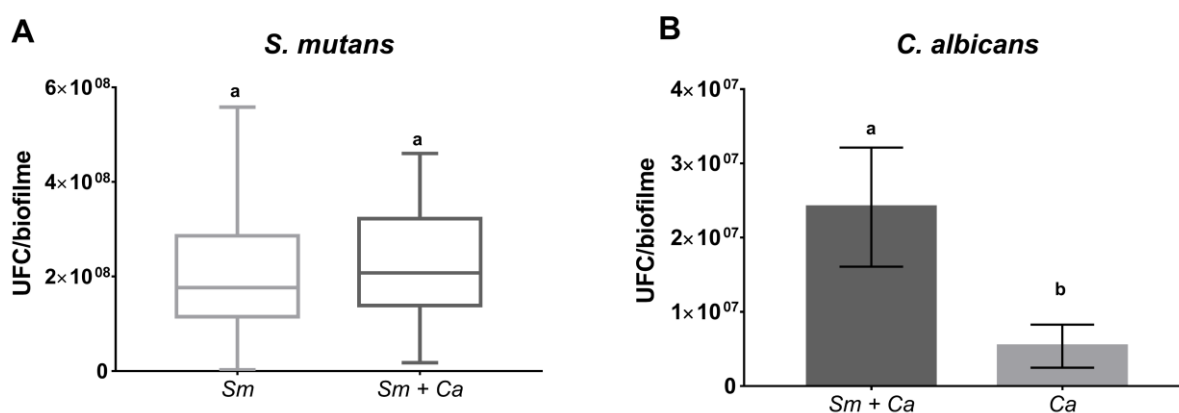
pH do meio de cultura dos biofilmes mistos e simples de *S. mutans* e *C. albicans* $n=12$ (4 replicatas de 3 ocasiões experimentais). O gráfico representa as médias e os desvios padrão. Sm: *S. mutans*, Ca: *C. albicans*. Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), letras diferentes indicam diferença.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 População Microbiana

Os dados de população de *S. mutans* e de *C. albicans* estão representados na Figura 7. Foram realizadas 3 ocasiões experimentais (n=12). Não houve diferença na população de *S. mutans* em biofilmes simples e misto (Teste Mann Whitney, $p=0,404$). Porém, houve diferença para *C. albicans*, pois no biofilme misto ocorreu maior quantidade de UFC/biofilme quando comparado ao biofilme simples de *C. albicans* (teste t não pareado, com correção de Welsh, $p<0,001$).

Figura 7 - Dados de contagem de unidades formadoras de colônia



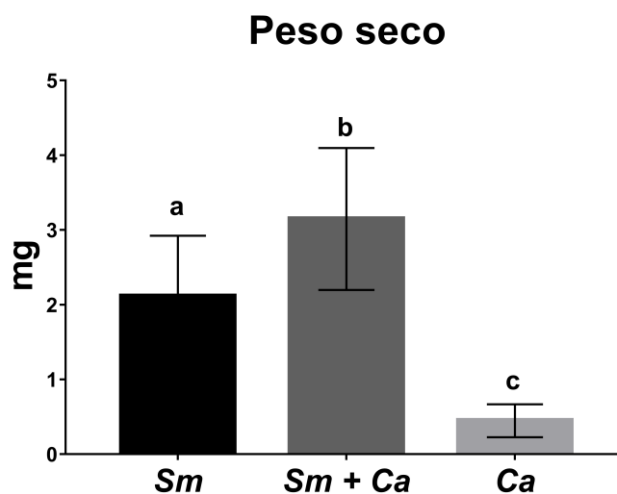
O gráfico A representa unidades formadoras de colônia em (população) de *S. mutans* em biofilmes simples de *S. mutans* e mistos (dados das duplicatas, n=12); no gráfico B estão representados os dados de *C. albicans* em biofilmes simples de *C. albicans* e mistos (dados das duplicatas, n=12). O gráfico A (*S. mutans*) representa a mediana e intervalo interquartil. No gráfico B (*C. albicans*) estão representadas a média e desvio-padrão. Sm: *S. mutans* e Ca: *C. albicans*.

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Peso Seco (Biomassa ou peso seco insolúvel)

A associação dos dois microrganismos resulta em biofilme com maior peso seco, comparado com biofilmes simples de cada microrganismo testado (Figura 8). Ainda, *C. albicans* simples forma biofilme com menor peso seco. Utilizou-se o mesmo n da população de biofilme (n=12).

Figura 8 - Dados do peso seco dos biofilmes



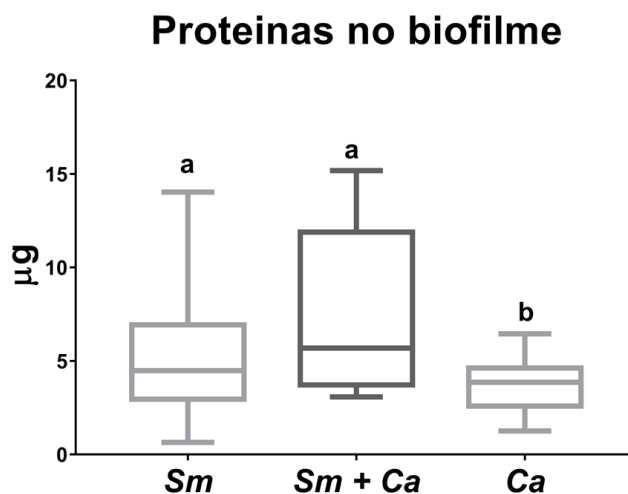
O gráfico representa a média e o desvio padrão do peso seco dos biofilmes mistos e simples de *S. mutans* e *C. albicans* n=12. Existe diferença estatisticamente significativa entre os três biofilmes ($p=0,001$; $p<0,0001$; ANOVA um critério, seguido de teste de Tukey). Sm: *S. mutans* e Ca: *C. albicans*.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Proteínas no Biofilme

A associação dos microrganismos resultou em biofilme com maior quantidade de proteínas (n=12), comparado a quantidade de proteínas nos biofilmes simples (Figura 9), sendo essa diferença estatisticamente significativa comparado com biofilme de *C. albicans* simples ($p=0,046$; Teste Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn). Assim, observa-se também que a menor quantidade de proteínas está presente no biofilme de *C. albicans*.

Figura 9 - Dados de proteínas dos biofilmes



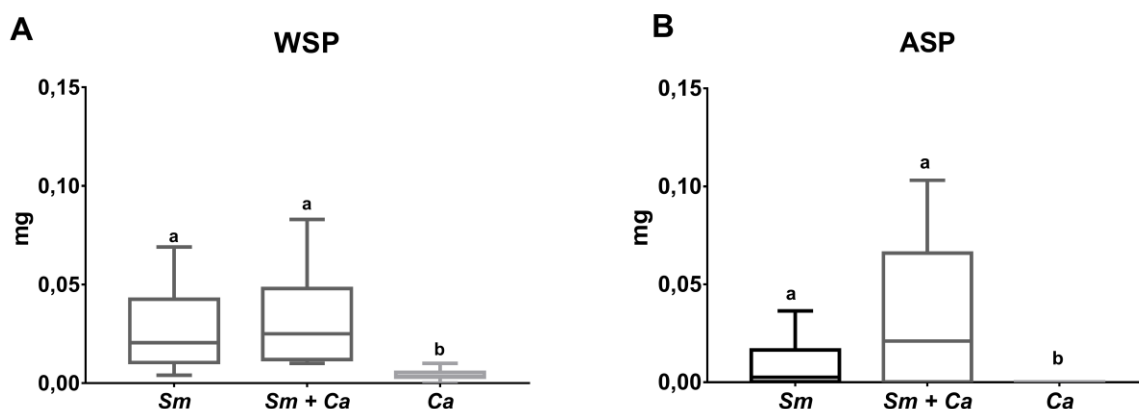
O gráfico representa a mediana e o intervalo interquartil das proteínas dos biofilmes mistos e simples de *S. mutans* e *C. albicans* (n=12). Sm: *S. mutans* e Ca: *C. albicans*.
Fonte: Elaboração própria.

5.5 Exopolissacarídeos na Matriz Extracelular

Foram avaliados os exopolissacarídeos solúveis em água (WSP) e insolúveis em água ou solúveis em álcali (ASP) (Figura 10). Para WPS, foram analisadas amostras de três experimentos (n=12) e não houve diferença na quantidade de WSP entre os biofilmes de *S. mutans* e misto. Porém, os biofilmes de *C. albicans* possuem menor quantidade de WSP comparado com os biofilmes de *S. mutans* e mistos (Teste Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn; $p < 0,0006$).

Para os dados de ASP (n=16), houve maior quantidade de ASP em biofilme misto comparado com biofilme de *C. albicans* ($p = 0,002$). Ainda, ocorreu diferença para os dois biofilmes simples ($p = 0,007$), mas não houve diferença estatística na quantidade de ASP entre biofilme misto e biofilme de *S. mutans* ($p > 0,05$; Teste Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn).

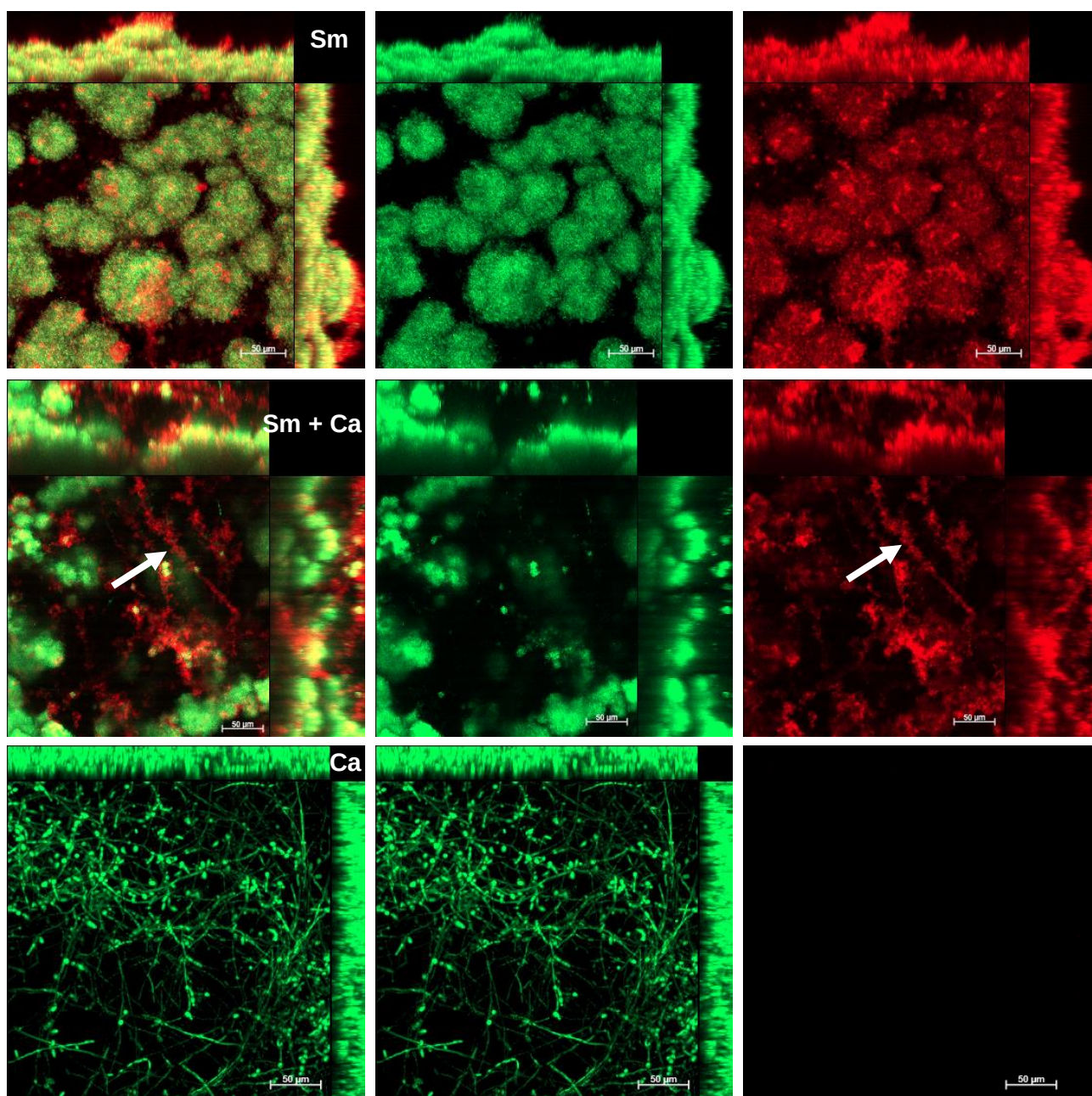
Figura 10 - Dados de WSP e ASP dos biofilmes



Os gráficos representam a mediana e o intervalo interquartílico de WSP e de ASP dos biofilmes mistos e simples de *S. mutans* e *C. albicans*. Sm: *S. mutans* e Ca: *C. albicans*.
Fonte: Elaboração própria.

5.6 Estrutura Tridimensional dos Biofilmes

Os biofilmes mistos apresentaram microcolônias (aglomerados de células microbianas) maiores que os biofilmes de *S. mutans*, enquanto essas estruturas estavam ausentes em biofilme de *C. albicans* (Figura 11). Ainda, a distribuição de exopolissacarídeos foi diferente em biofilmes mistos e simples de *S. mutans*, mas esse componente não pode ser visualizado em biofilmes de *C. albicans* (como esperado, porque a marcação é específica para α -glicanos produzidos por *S. mutans*). Em biofilmes mistos, EPS estão localizados ao redor das hifas (como indicado pela seta branca na Figura 11).

Figura 11 - Estrutura tridimensional dos biofilmes

Imagens representativas de microscopia confocal dos biofilmes mistos e simples de *S. mutans* e *C. albicans* com 43h de formação, marcados com Alexa Flúor 647 e SYTO9. Sm: *S. mutans* e Ca: *C. albicans*. A cor verde representa o conteúdo microbiano em cada biofilme, enquanto que a cor vermelha representa EPS na matriz extracelular. A seta branca representa hifa de *C. albicans* envolta por exopolissacarídeos produzidos por *S. mutans*. As imagens da primeira coluna mostram a sobreposição, enquanto as da segunda e da terceira ilustram cada componente individualmente.

Fonte: Elaboração própria.

Em 19h, a microscopia com as 4 marcações concomitantes demonstrou que em biofilmes simples de *S. mutans* (Figura 12) a estrutura foi semelhante à aquela

observada anteriormente em biofilme de 43h (apenas marcação de microrganismo pela GFP e de EPS da MEC).

Figura 12 - Estrutura tridimensional de biofilme de 19h

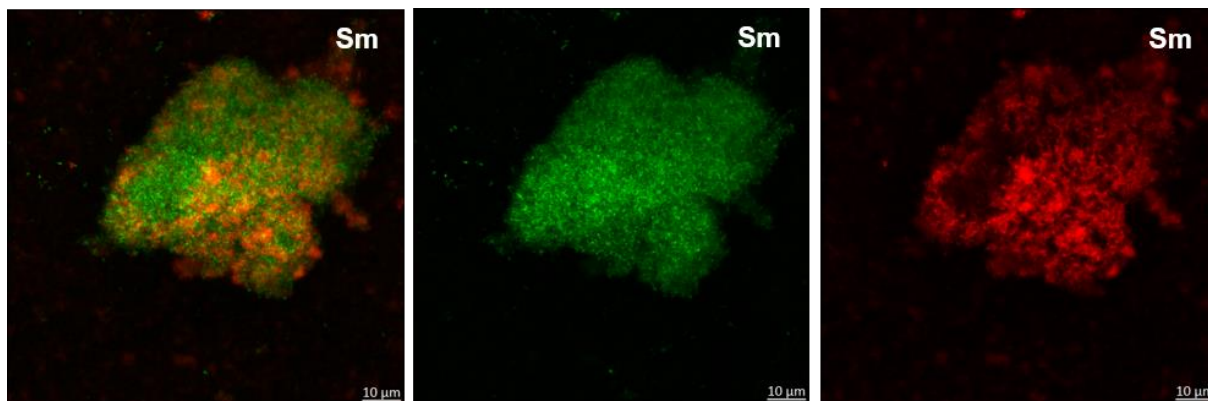
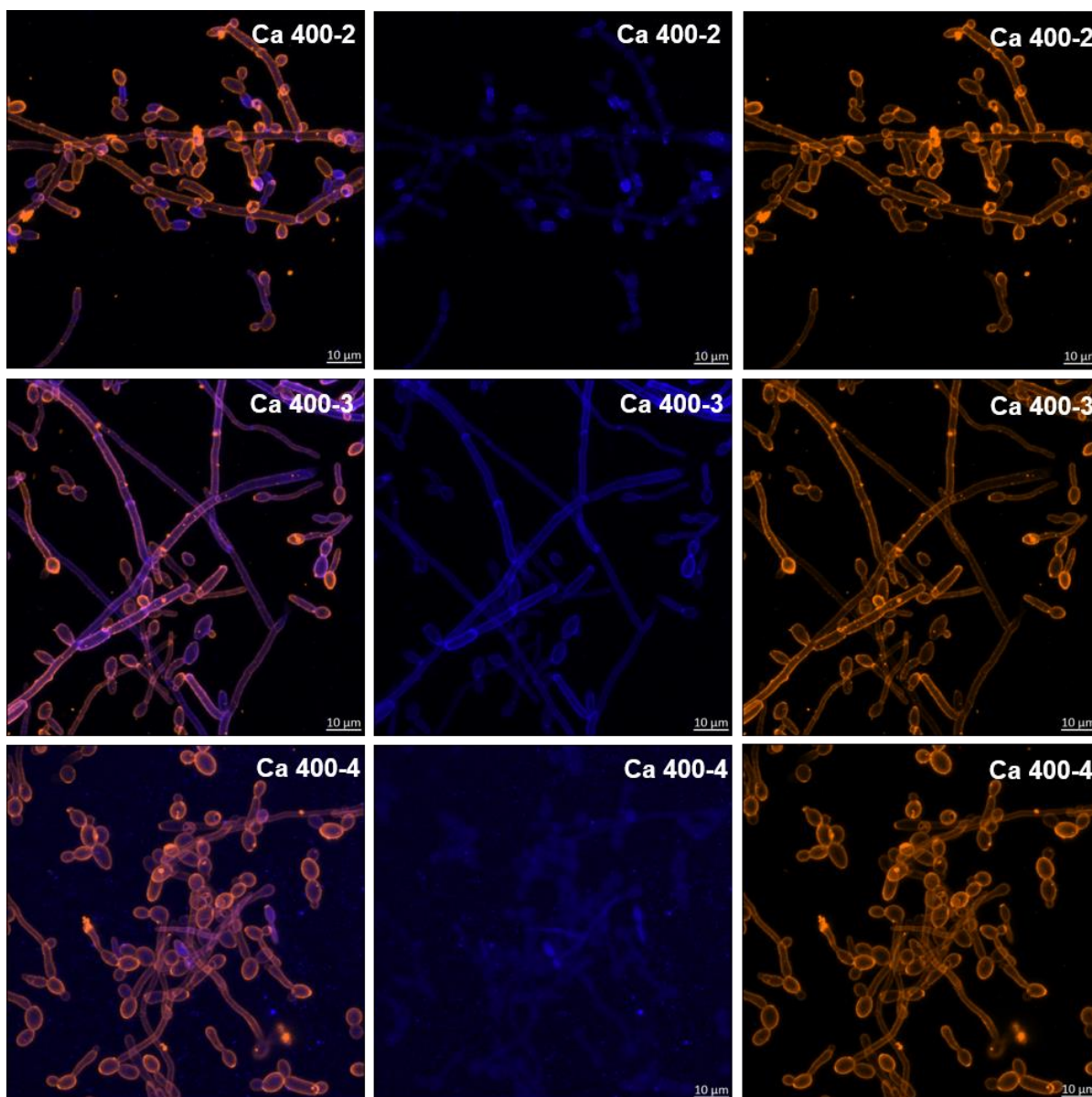


Imagem representativa de microscopia confocal do biofilme simples de *S. mutans* GFP com 19h de formação, marcado com Alexa Flúor 647 (objetiva de 63x). A cor verde representa as células de *S. mutans*, enquanto que a cor vermelha representa EPS na matriz extracelular. Na primeira coluna se observa a sobreposição, enquanto a segunda e a terceira ilustram cada componente individualmente.

Fonte: Elaboração própria.

Para os biofilmes simples formados por *C. albicans* ocorreu uma marcação mais evidente com os anticorpos para 1-3 β -glicanos (400-2, 400-3), com polissacarídeos localizados tanto intra quanto extracelular (Figura 13). Os controles utilizados demonstraram que não houve ligação não específica de anticorpo secundário. Esses biofilmes apresentavam majoritariamente células filamentosas. Porém, a marcação com anticorpo para 1,4 β -mananas e galacto 1-4 β -mananas (400-4) apresentou menor intensidade.

Figura 13 - Estrutura 3D de biofilmes de *C. albicans* marcados com 2 fluoróforos e anticorpo.

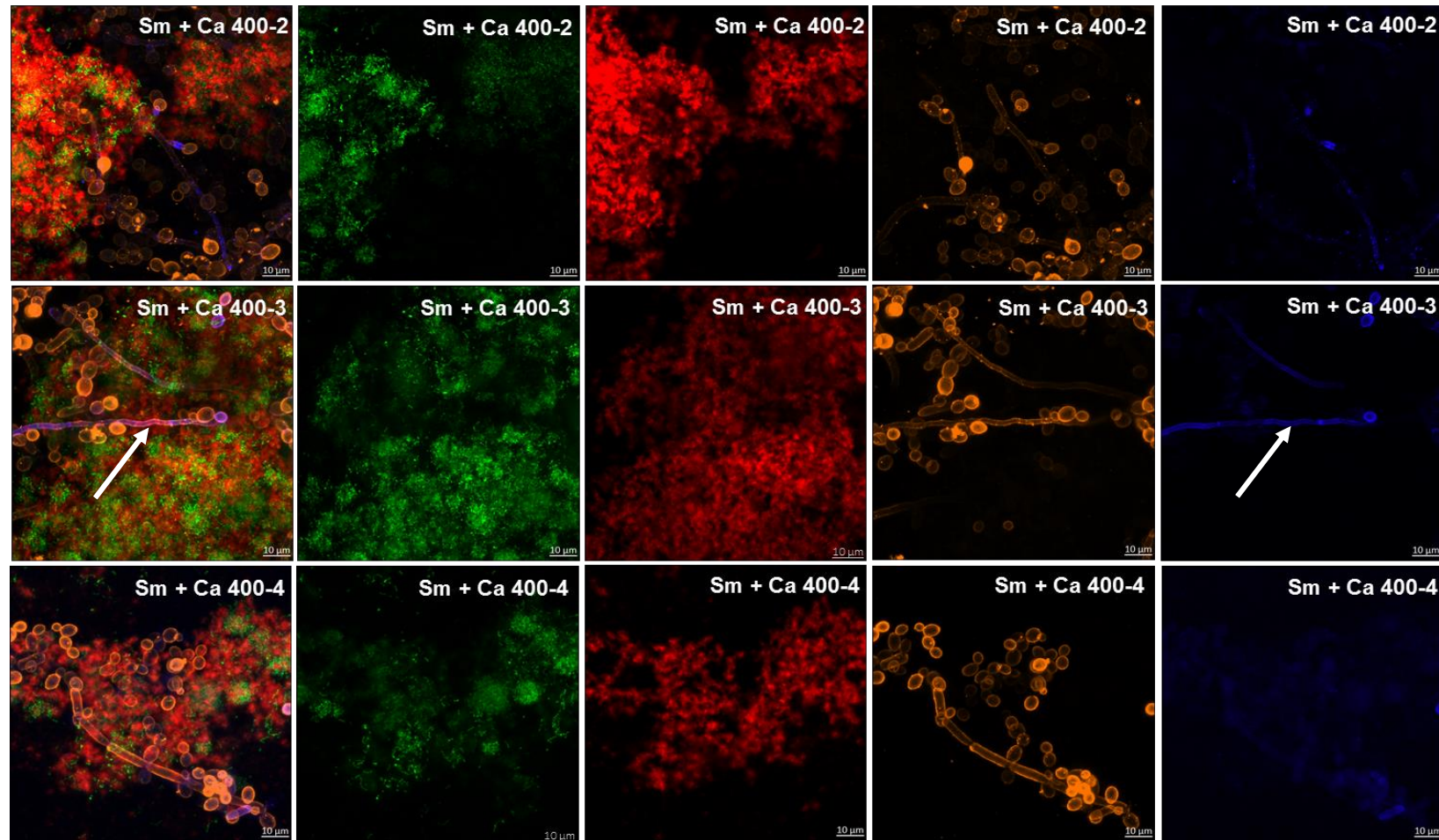


Imagens representativas de microscopia confocal dos biofilmes simples de *C. albicans* marcados com anticorpo primário (400-2, 400-3, 400-4) pareado com anticorpo secundário marcado com Alexa Flúor 405 e concavalina A conjugada com tetrametilrodamina (objetiva de 63x). A cor laranja representa as células microbianas do biofilme; a cor azul representa polissacarídeos produzidos por *C. albicans*. Na primeira coluna se observa a sobreposição, enquanto a segunda e a terceira ilustram cada componente individualmente.

Fonte: Elaboração própria.

Os biofilmes mistos com os 4 marcadores demonstraram menor marcação de polissacarídeos produzidos por *C. albicans*, com marcação mais acentuada em células filamentosas (comparado a células ovaladas - levedura) (Figura 14). Observou-se ainda, que as microcolônias e MEC de *S. mutans* se localizam ao redor de *C. albicans* (envoltas principalmente em hifas).

Figura 14 - Estrutura tridimensional do biofilme misto marcado com 4 marcadores.



Imagens representativas de microscopia confocal dos biofilmes mistos de *S. mutans* e de *C. albicans* (19h de formação), marcados com Alexa Flúor 647, anticorpo primário (400-2, 400-3, 400-4) pareado com anticorpo secundário conjugado com Alexa Flúor 405 e concavalina A conjugada com tetraerodamina. As cores verde e laranja representam as células microbianas de *S. mutans* e de *C. albicans* respectivamente; já a cor vermelha representa exopolissacarídeos produzidos por *S. mutans* e a cor azul representa polissacarídeos produzidos por *C. albicans*. A seta representa a marcação das hifas de *C. albicans* (que é melhor observada do que a marcação em levedura). Na primeira coluna se observa a sobreposição, enquanto as outras colunas representam cada componente individualmente.

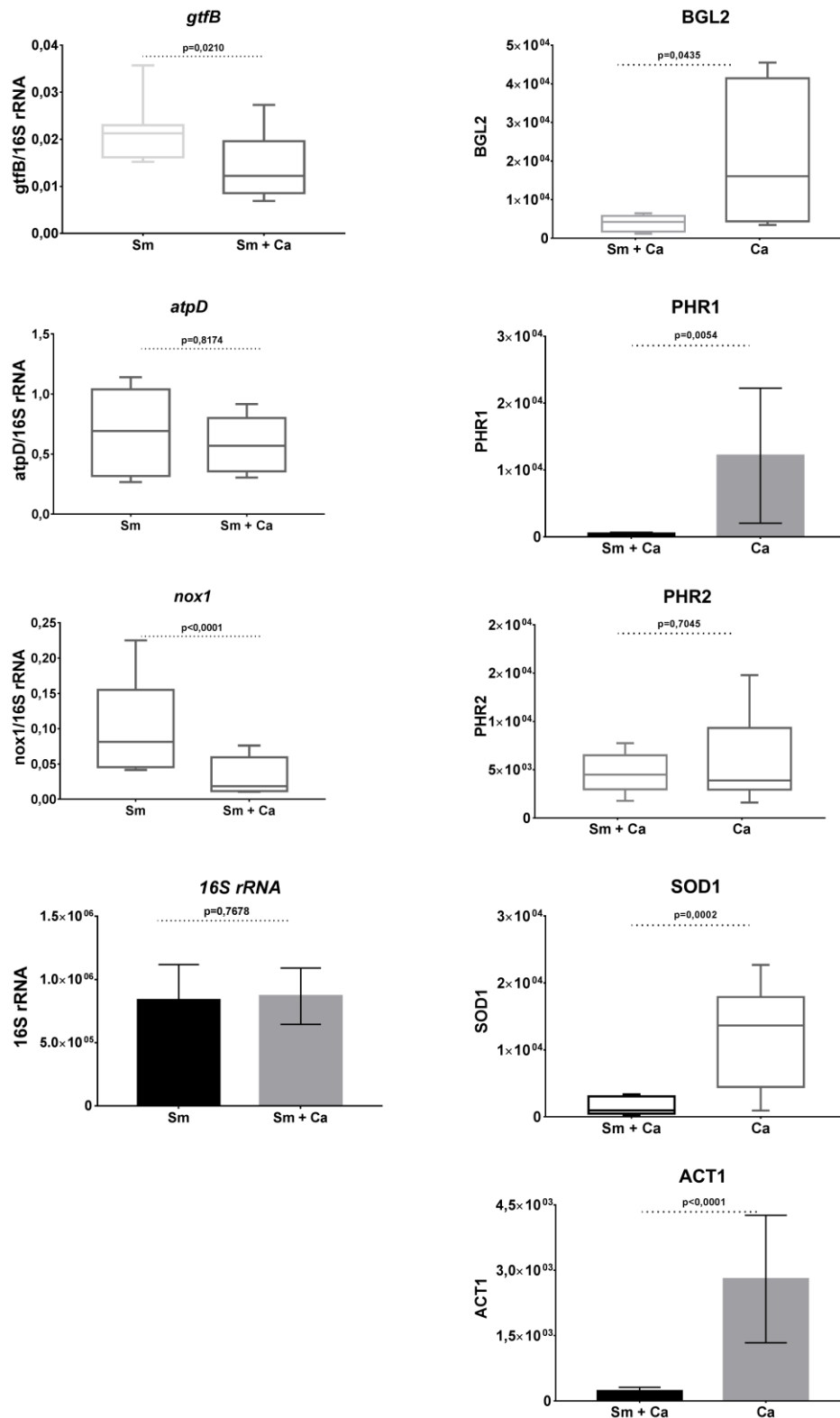
Fonte: Elaboração própria.

5.7 Expressão Gênica de *S. mutans* e de *C. albicans* em Biofilmes

A Figura 15 ilustra os dados de expressão dos genes de *S. mutans* (*atpD*, *gtfB* e *nox1*, normalizados por 16S rRNA) e de *C. albicans* (ACT1, BGL2, PHR1, PHR2 e SOD1) em biofilmes simples e mistos, obtidos em três experimentos, com dois cDNAs por experimento, e quantificação de expressão por qPCR em duplicata. A expressão dos genes de *C. albicans* não foi normalizada por ACT1 porque ocorreu diferença na sua expressão entre biofilmes mistos e de *C. albicans* apenas (como demonstrado na Figura 15).

Observou-se maior nível de expressão em biofilmes simples comparado com o biofilme misto para os genes *gtfB*, *nox1*, ACT1, BGL2, PHR1, PHR2 e SOD1. No entanto, para os genes *atpD* (tolerância ao estresse ácido de *S. mutans*), e PHR2 (tolerância ao estresse ácido de *C. albicans*), não houve diferença entre os biofilmes simples e misto ($p=0,817$; $p=0,705$).

Figura 15 - Dados de expressão gênica.



Expressão gênica de *S. mutans* e de *C. albicans* em biofilmes simples e mistos com 28h de formação. Os gráficos de *gtfB*, *atpD*, *nox 1*, BGL2, PHR2 e SOD1 representam mediana e intervalo interquartil. Os gráficos 16S rRNA, PHR1 e ACT1 representam a média e desvio-padrão. Sm: *S. mutans* e Ca: *C. albicans*.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Os dados deste estudo demonstraram comportamento semelhante entre o pH do meio do biofilme simples de *S. mutans* e do biofilme misto. No entanto, outros parâmetros como população microbiana, EPS (importante para a formação do biofilme), peso seco, proteínas e microscopia confocal, revelaram maior complexidade estrutural para biofilme misto de *S. mutans* e *C. albicans*, corroborando com estudos anteriores^{15,18,20,45}.

Para a cárie dentária, a virulência de *C. albicans* é atribuída a sua acidogenicidade e a sua natureza acidúrica, desenvolvimento de biofilme profuso, capacidade de assimilar e fermentar açúcares da dieta e de produzir proteinases que degradam colágeno (dentre outras exoenzimas). Contudo, este fungo não é reconhecido como verdadeiro agente patógeno para cárie dentária, no entanto, pode atuar como um agente secundário para o processo da cárie (especialmente em dentina)⁶³. Como se observou nos dados acima apresentados (peso seco e estrutura 3D do biofilme), biofilme simples de *C. albicans* apresentou estrutura menor e maior dispersão de suas células, comparado com biofilme misto e simples de *S. mutans*.

Geralmente, o pH do meio de cultura apresenta-se mais ácido em biofilmes mistos. In vivo, com o crescimento da microbiota acidogênica e acidúrica no biofilme, o meio se torna mais ácido, beneficiando bactérias acidúricas e reduzindo a diversidade microbiana^{32,93-96}. No biofilme misto também observamos o pH ácido, pela ação dos dois microrganismos (metabolização da sacarose por *S. mutans* e da glicose por *C. albicans*)⁹³⁻⁹⁶. Este perfil biológico foi verificado nos dados de pH e confirmados pelos dados de população microbiana e análise da estrutura 3D dos biofilmes mistos, em 19 e 43h. A espécie *C. albicans* não fermenta tão rápido os açúcares da dieta²⁴, especialmente sacarose, e por isso seu pH no biofilme simples permanece neutro em todas idades analisadas, nas condições experimentais testadas (o meio de cultura utilizado foi com sacarose). Ainda, em ambientes ácidos *C. albicans* produz proteinases que podem destruir o colágeno em lesões de cárie de dentina, facilitando a invasão da levedura para o interior dos túbulos dentinários⁶³.

Os dados de população microbiana demonstraram comportamento similar entre os biofilmes simples de *S. mutans* e misto (não houve diferença), porém verificou-se aumento populacional de *C. albicans* quando em associação com *S. mutans* como já reportado anteriormente (Figura 7). Assim, pela relação de comensalismo entre *S.*

mutans e *C. albicans*, biofilme misto apresenta um aumento na população de *C. albicans*, possivelmente mediado por EPS insolúvel produzido por *S. mutans*. Estes dados reforçam o panorama representado nos dados de peso seco, maior em biofilme misto indicando metabolização de sacarose e seus produtos pelas duas espécies.

A matriz extracelular é muito importante para a formação do biofilme e para aumentar sua virulência. Pois essa matriz limita a difusão de substâncias de dentro para fora do biofilme e também o contrário, dessa forma o ácido, responsável pela dissolução do esmalte fica acumulado, e a saliva não consegue exercer corretamente a sua função de neutralização. Assim, *S. mutans* modula a formação de microambientes acídicos dentro do biofilme e na interface biofilme/superfície de hidroxiapatita, por ser o principal produtor de EPS da matriz. Existe maior quantidade de EPS na matriz dos biofilmes mistos, porém não há diferença estatística entre EPS de *S. mutans* e misto. *S. mutans* secreta enzimas Gtfs que sintetizam glicanos que fazem parte dos exopolissacarídeos solúveis e insolúveis⁸. As Gtfs são componentes da película salivar e se adsorvem nas superfícies de outros microrganismos orais convertendo os mesmos em produtores de glicano. A espécie *C. albicans* é um dos microrganismos aos quais as Gtfs se ligam, particularmente a GtfB, e forma grandes quantidades de EPS na presença de sacarose, e isso favorece a adesão e colonização de outros microrganismos¹⁸. Além disso, as Gtfs na película salivar sintetizam glicanos na superfície dentária favorecendo a aderência e o acúmulo de microrganismos nos dentes. Ainda, presença de *C. albicans* em biofilmes, induz a expressão dos genes *gtfs* de *S. mutans*, aumentando a colonização dos microrganismos, a quantidade de EPS na matriz do biofilme e a virulência dos biofilmes^{1,17,20}. Esses fatores justificam a maior quantidade de EPS em biofilmes mistos dessas espécies, assim como a maior quantidade de biomassa, proteínas e população, pois nos biofilmes mistos há maior adesão e colonização comparado aos biofilmes simples. Entretanto, não houve diferença no nível de expressão do gene *gtfB* para o biofilme misto e simples de *S. mutans* no presente estudo, porque a fase de desenvolvimento dos biofilmes avaliadas foi diferente das fases avaliadas em estudos anteriores^{19,20}. Assim, os dados obtidos são antagônicos à hipótese de que *C. albicans* poderia prevenir cáries²¹, corroborando diversos estudos que indicaram a participação na cariogenicidade do biofilme^{19,44,45}.

A análise por microscopia confocal demonstrou que os biofilmes mistos possuem uma arquitetura 3D mais complexa do que os biofilmes simples de *S. mutans* e de *C.*

albicans, o que era esperado baseado na literatura^{17,20,48}, e é reforçado com os dados de população microbiana, peso seco do biofilme e EPS (principalmente ASP) de biofilmes mistos igualmente superiores. Porém, verificou-se que a marcação de polissacarídeos de *C. albicans* com anticorpos específicos foi menor neste tipo de biofilme. Este comportamento pode ser porque (i) *C. albicans* beneficia-se quando em associação com a bactéria (comensalismo), diminuindo a produção dos seus próprios polissacarídeos avaliados; e/ou, (ii) pode existir ligação entre β 1,3 e 1,4 glicanos de *C. albicans* e Gtfs de *S. mutans*, impedindo a marcação com os anticorpos estudados. No entanto, a última hipótese poderá ser respondida com o uso de técnicas de espectrometria (e.g., cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear).

O perfil de expressão gênica de *S. mutans* em biofilmes com 28h dos genes *gtfB* e *atpD* *S. mutans* foi diferente daquele encontrado anteriormente em biofilmes com outras idades (22, 32 e 42h)²⁰, porém, a expressão de *nox1* (estresse oxidativo) está sendo reportada pela primeira vez. Verificou-se maior expressão em biofilmes simples das duas espécies microbianas, corroborando com os dados de microscopia confocal de *C. albicans* (na marcação com anticorpos), marcação mais acentuada em biofilmes simples, devida a expressão aumentada de genes para a MEC (BGL2 e PHR1, que formam β 1,3 glicanos). Entretanto, para avaliar se os biofilmes mistos são mais tolerantes ao estresse oxidativo, estudo futuro deverá verificar a sobrevivência dos microrganismos após exposição à agentes específicos (e.g., peróxido de hidrogênio). Ainda, não houve diferença na expressão dos genes de tolerância ao estresse ácido *atpD* (*S. mutans*) e PHR2 (*C. albicans*). Por haver maior desenvolvimento na estrutura de biofilmes mistos (confirmada pela microscopia confocal, população microbiana e proteínas e composição da MEC), a análise de expressão gênica indica que há lentidão no metabolismo dos biofilmes simples de ambas espécies, pois os biofilmes simples apresentaram menor quantidade de parâmetros avaliados. Assim, o perfil de expressão dos genes de *C. albicans* em biofilmes simples comparados à biofilmes mistos é bem distinto e ainda não foi relatado na literatura.

Portanto, baseado nos dados apresentados, o biofilme misto apresenta maior complexidade estrutural comparado a biofilmes simples, o que poderia influenciar a patogenicidade e justificar a ocorrência de cárie mais agressiva em crianças devido à combinação dos dois microrganismos no biofilme¹⁵.

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

28. Islam B. Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit.* 2007; 13 (11): 196-203.
29. Leong PM, Gussy MG, Barrow S-YL, de Silva-Sanigorski A, Waters E. A systematic review of risk factors during first year of life for early childhood caries. *Int J Paediatr Dent.* 2012; 23 (4): 235-50.
30. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88 (11): 982-90.
31. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 22 (2): 94-100.
32. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Rest.* 2011; 90 (3): 294-303.
33. Berkowitz RJ, Turner J, Hughes C. Microbial characteristics of the human dental caries associated with prolonged bottle-feeding. *Arch Oral Biol.* 1984; 29 (11): 949-51.
34. Milnes AR, Bowden GH. The microflora associated with developing lesions of nursing caries. *Caries Res.* 1985; 19 (4): 289-97.
35. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (3): 1001-9.
36. Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (1): 81-7.
37. Berkowitz RJ, Koo H, McDermott MP, Whelehan MT, Ragusa P, Kopycka-Kedzierawski DT, et al. Adjunctive chemotherapeutic suppression of mutans streptococci in the setting of severe early childhood caries: an exploratory study. *J Public Health Dent.* 2009; 69 (3): 163-7.
38. Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R, Moore A, Hughes CV, et al. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res.* 2010; 44 (5): 485-97.
39. Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, et al. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun.* 2012; 80 (2):620-32.
40. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EMM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *C. albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53 (8): 755-64.
41. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (10): e1003616.

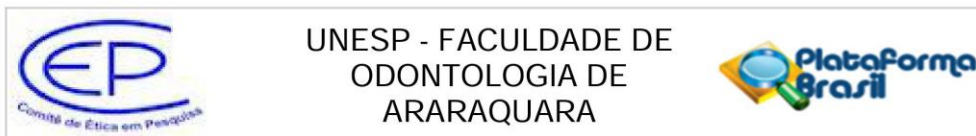
42. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. *ISME J*. 2014; 8 (10): 2256-71.
43. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida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

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

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

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

ANEXO – Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Patogenicidade de interação microbiana e estratégia terapêutica para controle de biofilme patogênico

Pesquisador: MARLISE INEZ KLEIN

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55823016.7.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.710.202

Apresentação do Projeto:

A presente hipótese é a de que a patogenicidade da interação em biofilme entre *S. mutans* e *C. albicans* pode ser controlada por estratégia preventiva-terapêutica que tem como 2 alvos a matriz extracelular do biofilme e as vias que regulam os estresses ácido e/ou oxidativo em ambas as espécies ainda não é conhecido: (i) quais são os mecanismos de ambas as espécies que atuam sinergicamente para aumentar a patogenicidade do biofilme; e (ii) o efeito de agentes anti-biofilme já avaliados em biofilmes formados por *S. mutans* no biofilme "hipercariogênico" formado por *S. mutans* e *C. albicans*.

Objetivo da Pesquisa:

Para testar a hipótese, os objetivos específicos do projeto são: 1) Avaliação dos mecanismos de *S. mutans* (além de produção de MEC rica em exopolissacarídeos) e de *C. albicans* que contribuem para aumentam a patogenicidade do biofilme misto. Serão formados biofilmes mistos e simples de cada espécie em presença de sacarose, e os mesmos serão examinados por métodos bioquímicos (biomassa, composição da MEC), microbiológicos (unidades formadoras de colônia - UFC), e de microscopia (estrutura do biofilme). Ainda, será determinada a dinâmica de expressão dos genes de *S. mutans* e de *C. albicans* associados com patogenicidade em biofilme misto. 2) Determinação do efeito de tt-farnesol e miricetina em biofilmes "hipercariogênicos" formados por *S. mutans* e *C.*

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

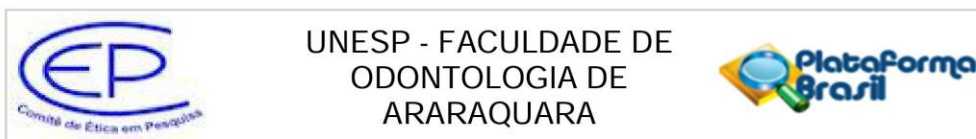
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.710.202

albicans. Biofilmes mistos in vitro serão tratados como os agentes topicamente duas vezes ao dia, e o número de UFC, biomassa do biofilme, composição da MEC (quantificação de exopolissacarídeos) serão avaliados. Ainda, será examinado se as vias metabólicas que contribuem para a patogenicidade dos biofilmes (determinadas no objetivo 1) são reguladas pela estratégia terapêutica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não existem riscos sociais ou físicos significantes para a doação de saliva. O único risco é que o voluntário poderá engolir o pedaço de filme de parafina. Se isso acontecer, o filme se dissolverá no estômago do mesmo modo como uma goma de mascar se dissolve. Ainda, existe o inconveniente de o voluntário realizar doação mais de uma vez durante o período da pesquisa (2 a 3 anos). O voluntário pode se recusar e se retirar da pesquisa a qualquer momento, por qualquer razão.

Benefícios: O voluntário não se beneficiará por participar neste estudo. No entanto, os dados desse estudo permitirão alguns avanços científicos, e ajudarão no desenvolvimento de novas terapias.

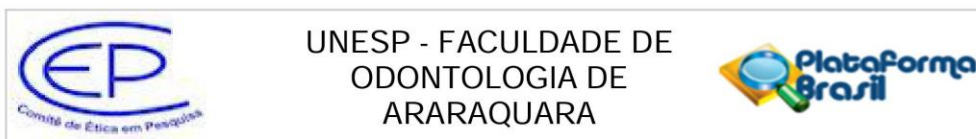
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para responder os objetivos propostos será coletada até quatro vezes por ano, durante 3 anos a saliva dos participantes, a coleta leva cerca de 20 minutos. com o material coletado, Serão formados biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* e simples de cada espécie em presença de sacarose, e os mesmos serão examinados por métodos bioquímicos (biomassa, composição da MEC), microbiológicos (unidades formadoras de colônia - UFC), de microscopia (estrutura do biofilme), e de expressão gênica de ambas as espécies via RTqPCR de genes das vias metabólicas de resposta aos estresses ácido e oxidativo. (2) Determinar o efeito de tt-farnesol e miricetina em biofilmes "hipercariogênicos" formados por *S. mutans* e *C. albicans*. Para tanto, biofilmes mistos in vitro serão tratados como os agentes topicamente (1 min) duas vezes ao dia, e o número UFC, biomassa do biofilme, composição da MEC (quantificação de exopolissacarídeos) serão avaliados. Ainda, será examinado se as vias metabólicas que contribuem para a patogenicidade dos biofilmes (determinadas no objetivo 1) são reguladas pelos agentes utilizados na estratégia terapêutica. A execução do projeto trará novos insights para a patogênese de biofilmes formados por bactéria e fungo, e potencial de controle de virulência por estratégia terapêutica que tem alvos relacionados com a patogenicidade

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de um projeto universal aprovado, foram apresentados todos os documentos necessário.

Endereço: HUMAITA 1680	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459	E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.710.202

o risco benefício está descrito de modo claro e objetivo atendendo os princípios bioéticos em pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas as solicitações, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_785503 E1.pdf	31/08/2016 12:16:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Univesal_2016_revisado.pdf	20/07/2016 15:22:09	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada_CEP_universal2016.pdf	06/05/2016 08:39:15	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_FINANCEIRO_Universal_2016.pdf	05/05/2016 21:33:59	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Outros	TERMO_DE_CIENTIA_DO_ORCAMENTO.pdf	05/05/2016 21:32:30	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Outros	Permissao_uso_clinica_Universal_2016.pdf	05/05/2016 21:26:58	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Outros	RESSARCIMENTO_GASTOS_Universal_2016.pdf	05/05/2016 21:25:22	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Univesal_2016.pdf	05/05/2016 21:23:21	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_cumprimento_das_normas_CEP_Universal_2016.pdf	05/05/2016 21:23:00	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Outros	AUTORIZA_UTILIZAR_LABORATORIO_Universal_2016.pdf	05/05/2016 21:21:06	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_UNIVERSAL_2016.pdf	05/05/2016 21:11:48	MARLISE INZ KLEIN	Aceito
Cronograma	Cronograma_Universal_2016.pdf	05/05/2016 21:09:48	MARLISE INZ KLEIN	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

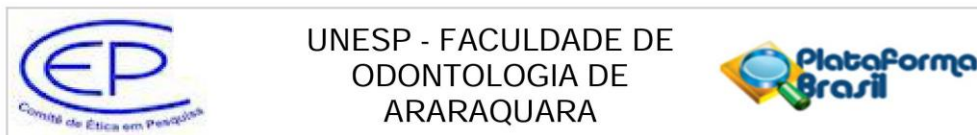
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.710.202

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 02 de Setembro de 2016

Assinado por:
Lígia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a reprodução deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de
defesa**

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 26 de Fevereiro de 2018