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

Chaiene Evelin Zago

"Fatores de virulência e infecção epitelial *in vitro* de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA)"

ARARAQUARA
2015

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

Chaiene Evelin Zago

"Fatores de virulência e infecção epitelial *in vitro* de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA)"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção de título de Doutor em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani
Co-orientadora: Dra. Sónia Silva

ARARAQUARA
2015

Chaiene Evelin Zago

"Fatores de virulência e infecção epitelial *in vitro* de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA)"

Tese para obtenção do grau de Doutor

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

2° Examinador: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

3° Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

4° Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

5° Examinador: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 27 de março de 2015.

Dados Curriculares

Chaiene Evelin Zago

NASCIMENTO	04/10/1987 - Ipatinga, Minas Gerais
FILIAÇÃO	Osny Zago Sueli de Lourdes Faria Zago
2006 a 2010	Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2006 a 2010	Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Pediatria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2011 a 2015	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2011 a 2013	Estágio docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2013 a 2014	Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE – Capes) no Departamento de Engenharia biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal.
2014 a 2015	Estágio docência na Disciplina de Clínica Integrada do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014 a 2015	Estágio de treinamento na Disciplina de Clínica Integrada do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho:

À ***Deus*** pelo dom da vida, por me abençoar com uma família maravilhosa, por todas oportunidades a mim concedidas e por me presentear com tantas pessoas queridas que fazem parte do alicerce de todas as minhas conquistas. Por sempre me guiar, por me capacitar a vencer cada desafio e por todos os sonhos que o Senhor tem permitido tornar-se realidade.

"Uma noite eu tive um sonho...
Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e, através do céu, passavam cenas da minha vida.
Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.
Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que, muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.
Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:
- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.
O Senhor me respondeu:
- Meu querido filho, jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços".
(Margareth Fishback Powers)

Aos meus pais, *Sueli* e *Osny*, meus primeiros mestres, que me ensinaram a enfrentar as dificuldades, e não a teme-las; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. A vocês, meus amados pais, que me ensinaram que os sonhos não são bobagens e que lutar pela realização deles é o meu dever...!!! Pelo amor incondicional e apoio constante em todas as etapas da minha vida! Pela, sempre presente, certeza em minha capacidade, mesmo quando eu duvidava. Nada que eu tenha conquistado em minha vida seria possível sem o carinho e a presença de vocês dois.

A vocês pais, dedico esta vitória!

Ao meu irmão, *Chinader*, por torcer por mim e acreditar na minha capacidade. Por me ensinar que ser irmão é muito mais que dividir a atenção dos nossos pais, que é ser companheiro, mesmo a distância… que é querer sempre o melhor para o outro… que é se doar sem exigir nada em troca… e por me mostrar que o laço que nos une é mais forte que nossas diferenças de opiniões.

"Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes."

(Isaac Newton)

Agradecimento Especial

À *Deus* por me guiar e iluminar em todos os momentos e por me ajudar a passar por todos os obstáculos chegando até aqui. Obrigada por ser meu refúgio, minha força e nunca ter me abandonado nesta jornada. Por permitir que meus dois sonhos de criança se transformassem em uma verdadeira caminhada de vida e por me fazer acreditar que tudo iria dar certo!

Aos meus pais, *Sueli* e *Osny* que nunca mediram esforços para me fazer feliz… que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por estarem sempre do meu lado, nos momentos de alegria e nos momentos de fraquezas, me dando apoio, ânimo e incentivo para que eu sempre seguisse em frente. Minha eterna gratidão, pois souberam compreender a minha ausência do convívio familiar para me dedicar aos estudos e por nunca terem questionado minhas escolhas. As palavras são pequenas e insuficientes para expressar o amor que eu sinto por vocês. Sem o amor sem limites, o carinho, o esforço e apoio de vocês, eu não teria conseguido realizar mais este sonho. Vocês são meus exemplos, de quem eu me orgulho muito! Amo muito vocês!!!

Ao meu irmão, *Chinader* pelo amor, amizade, preocupação e pela torcida sincera! Obrigada por acreditar na minha capacidade, por estar sempre ao meu lado, torcendo por mim e valorizando minhas conquistas.

A minha avó *María* pelo carinho, apoio, preocupação e torcida. Obrigada por se fazer tão presente, mesmo na distância…!!!! Agradeço por todas as orações, que muito me protegeram, me iluminaram e me deram forças suficiente para seguir sempre em frente.

Ao meu namorado *Fred* que apareceu de uma forma quase inexplicável na minha vida, e aos poucos, foi preenchendo meus dias com amor e alegria. Obrigada por respeitar minha individualidade, minhas escolhas e decisões... Por entender as horas em que ficava distante, seja por causa dos experimentos no laboratório ou pelos momentos dedicados ao computador... Por me ajudar em algumas etapas deste trabalho, mesmo sem entender direito qual seria a aplicação... Muito obrigada, amor, por estar sempre ao meu lado, por me ajudar incondicionalmente e vibrar com as minhas vitórias... por se alegrar com as minhas alegrias e tornar meus problemas menores...

Ao meu orientador Prof. Dr. *Carlos Eduardo Verganí*, exemplo de dedicação à ciência. Acompanhá-lo durante esses 4 anos, me deu a oportunidade de conhecer e admirar o professor… o pesquisador com tamanha capacidade intelectual e dinamismo. Agradeço ao senhor pela confiança em mim depositada, por todas as oportunidades concedidas, por acreditar no meu potencial e por afastar o medo das coisas que não compreendia, até que pudesse compreendê-las. Obrigada por todas as sugestões e críticas, pela paciência em me ensinar e mostrar que sou capaz de atingir meus objetivos. Agradeço também, por ter me dado a chance de ser sua orientada e poder "absorver" um pouco do seu conhecimento e competência!

"*E*ducar

é um exercício

de imortalidade.

De alguma forma continuamos a viver

naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo

pela magia da nossa palavra.

O professor, assim, não morre jamais...".

(Rubem Alves)

A minha orientadora em Portugal, Profa. Dra. *Joana Azeredo* pessoa com conhecimento inestimável, e fonte de inspiração acadêmica… agradeço pelo carinho e receptividade. Obrigada por ter acreditado no meu trabalho, por me conceder a oportunidade de ser sua orientada durante 6 meses e por todo conhecimento compartilhado. À senhora, todo meu agradecimento, respeito e admiração!

A minha co-orientadora, Dra. *Sónia Sílva* pela confiança em mim depositada e por ter aceito prontamente o convite de me co-orientar. Pela colaboração e parceria no trabalho em equipe, paciência e amizade. Obrigada pela acolhida, receptividade e por me fazer sentir como se já estivesse no DEB (Departamento de Engenharia Biológica) à tempos. Agradeço a você, Soninha, pela valiosa contribuição para a realização desta pesquisa!

A minha "orientadora" de coração, Profa. Dra. *Paula Volpato Sanitá* pela ajuda prestada e horas despendidas explicando como escrever um projeto, um artigo em inglês ou responder revisores pela primeira vez… ao ajudar na realização das análises estatísticas… e nas correções de relatórios, abstracts, painéis, artigos e tese. Obrigada pela amizade, paciência e dedicação. Sua energia sempre me inspira e me faz acreditar que somos capazes, desde que nos esforcemos e façamos o nosso melhor (Yes, we can!!!). Seu brilhantismo e sua competência são exemplos que eu sempre levarei comigo!

"*O* professor sábio sabe que cinquenta e cinco minutos de trabalho mais cinco minutos de risada valem o dobro do que sessenta minutos de trabalho invariável."

(Gilbert Highet)

Agradecimentos

A toda minha família… *tios*, *tias*, *primos*, *primas* e *cunhada* que sempre me apoiaram, incentivaram, torceram por mim e por estarem sempre ao meu lado! Obrigada pelo carinho e pela confiança que vocês depositam em mim e em minhas escolhas.

A minha querida Profa. Dra. *Lourdes dos Santos Pinto* por me dar as primeiras orientações nos caminhos da Iniciação Científica e por despertar o gosto pela ciência baseada em evidências. Pelo carinho e pela contribuição para minha formação acadêmica e pessoal!!! A senhora é sempre lembrada com muito carinho, respeito e admiração… Tuka, você também faz parte dessa história!

Aos *amigos* de ontem, hoje e sempre, que mesmo longe nunca deixaram de participar das etapas mais importantes da minha vida, **Laís**, **Mariana**, **Carolina**, **Vittor**, **Paulo Antônio**, **Gabriela**, **Luiza**, e **Patrícia**.

Aos *amigos e companheiros* de Pós-Graduação, em especial à Amandinha, Beatriz, Camila, Claudinha, Denise, Eduardo, Fernanda, Jefferson, Juliana, Kássia, Lívia, Maria Izabel, Paulinha, por todos os momentos que passamos juntos, pela convivência agradável, amizade, pelas trocas de experiência e aprendizado mútuo que nos enriqueceram tanto.

Aos *amigos* que já concluíram a Pós-Graduação e, mesmo fisicamente distantes, continuam presentes e carinhosamente lembrados, especialmente Ana Paula, Cadu (in memorian),

Camilinha, Camilo, Carol Chaves, Cristiane, Delise, Fernanda Izumida, Karen, Marianinha e Patrícia. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e por todo apoio e torcida!

À *Ana Carol Becci, Bia, Ju, Fer, Érica, Aion, Nathi*, meus amigos queridos e sempre presentes, o que seriam de todos esses anos sem vocês? Como descrever aqui, todos os momentos que dividimos e compartilhamos juntos? Além de horas de laboratório, dividimos também momentos de aflição, medo e angústias… no entanto, compartilhamos muito mais que trabalho, dedicação, esforço, alegrias, descontrações e emoções! É difícil descrever a importância singular de cada um de vocês durante todos esses anos! Obrigada pela amizade, cumplicidade, carinho, apoio e torcida… obrigada por serem minha segunda família e tornarem meus dias mais alegres.

Aos meus *amigos de Portugal*, em especial a Tânia, Márcia, Eduarda, Marta, Patrícia, Célia, Leonel, Carlos Tiago, Ana Henriques, Ana Oliveira, Diana, Graça e Sónia. A vocês o meu muito obrigada por terem me acolhido tão bem, por me fazerem sentir como se eu já estivesse em Braga à tempos e sobretudo pela amizade sincera. Agradeço as ajudas e esforços para me distraírem e fazerem com que a saudade de casa fosse amenizada. Obrigada pela preocupação, pelo carinho, apoio, torcida e atenção que tiveram por mim durante os 6 meses. Agradeço também, as inúmeras e divertidas horas de trabalho que passamos juntos no laboratório, pelos conhecimentos compartilhados, por ouvirem meus desabafos, pelas risadas e happy hours… Conhecer e trabalhar com vocês foi um grande privilégio!!! Vocês serão sempre lembrados por mim, com muito carinho, admiração e gratidão! Contem sempre comigo!

Às *bolsistas de Apoio Técnico*, Stela, Rayssa, Sarah e, especialmente, Érica, pelo carinho, atenção e eficiência nos trabalhos de laboratório e sobretudo, pela nossa amizade. Agradeço toda ajuda, prontamente prestada, para a preparação dos materiais necessários para a execução dos experimentos. Somente nós sabemos, verdadeiramente, o “tamanho” deste

trabalho! Muito obrigada pelos momentos alegres compartilhados dentro e fora do laboratório.

Aos *alunos de iniciação científica*, Marcos, Carla e Virgínia, pela dedicação, carinho, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de aprendermos juntos. Vocês foram muito importantes na minha formação profissional.

Às *turmas 84 e 85* pelos momentos compartilhados durante o período de estágio docência. Foi com vocês que pela primeira vez, aprendi que a relação de ensinar e aprender é um processo mútuo, de responsabilidade e intensidade que ultrapassa quaisquer metodologias ou técnicas. E foi com vocês também que tive a certeza que esse é o meu lugar.

À *Paula Barbugli, Aline e Janaina* pela dedicação, carinho, ensinamentos e ajudas com equipamentos, kits e metodologias. Admiro a inteligência e os conhecimentos de vocês, sobretudo, admiro por vocês fazerem questão de compartilhá-los.

À Profa. Dra. *Marlise* outro exemplo de vida docente e dedicação à ciência. Obrigada por todas sugestões, pela paciência e por compartilhar seu imenso conhecimento e competência! A você, todo meu agradecimento, respeito e admiração.

Aos *Professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível*, Ana Cláudia, Ana Lúcia, Eunice, Ewerton, Janaina e Paula pelo apoio, ensinamentos e ótima convivência. Cada um, com seu jeito próprio, me acolheu e me ajudou, sempre que precisei, ao longo desses anos!

Aos *Docentes do Curso de Pós-Graduação* em Reabilitação Oral e do *Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese* desta Faculdade, pela amizade, dedicação, orientação, e ensinamentos transmitidos, essenciais para minha formação pessoal e profissional.

Aos *funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese* desta Faculdade, em especial à Martinha, Miriam, Dulce, Sílvia, Adelaide e Adelaidinha, pela paciência, preocupação, torcida, pelo convívio agradável e disposição em sempre me ajudar e principalmente pelo carinho desprendido durante esses 4 anos de convivência.

Aos *funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca*, Mara, Alexandre, Cristiano, Marley, Ceres e Inês, pela paciência, atenção, informações prestadas, dedicação com que sempre me trataram e pela assistência burocrática.

Aos Professores *Carlos Alberto Costa, Adriana Marcantonio* e *Carlos Rossa* por terem cedido, em alguns momentos, as instalações e equipamentos de seus laboratórios para que parte do trabalho pudesse ser realizado.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara*, na pessoa da Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e Vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato pelo carinho, atenção, estrutura, suporte e apoio para a realização deste projeto.

Ao *Departamento de Engenharia Biológica* (DEB) da Universidade do Minho, por ter me acolhido, pela estrutura, suporte e apoio para a realização deste projeto.

À *CAPES* pela concessão das bolsas de Doutorado e PDSE (Processo 9013-13) para desenvolvimento deste projeto.

Aos *Professores Membros da Banca Examinadora* pela presteza e por terem aceito o convite de avaliar e enriquecer meu trabalho.

Ao *Louís*, pela prontidão que demonstrou ao revisar o inglês dos artigos que constam na Tese.

"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, porque cada pessoa é única
e nenhuma substitui a outra!
Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só, porque
deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.
Essa é a mais bela responsabilidade da vida
e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso. "
(Charles Chaplin)

Agradeço a *todos* que, embora não tenham sido citados, mas participaram desta etapa da minha vida contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão!!!

"A beleza não está na partida nem na chegada, mas na travessia."
(Guimarães Rosa)

"Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios,

incompreensões e períodos de crise...

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

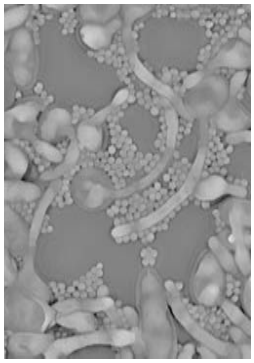
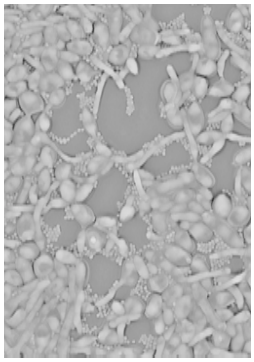
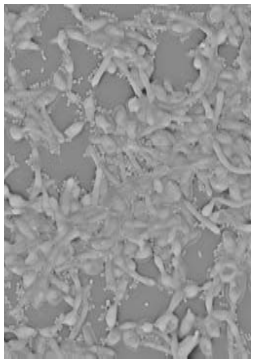
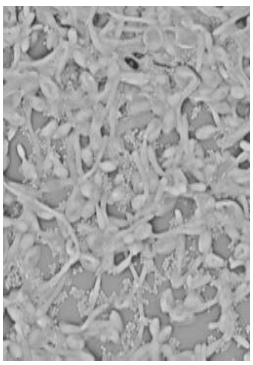
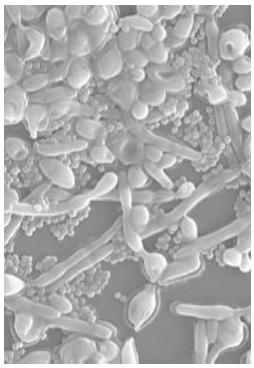
É ter coragem para ouvir um 'não'.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo …"

(Fernando Pessoa)

Resumo

Zago CE. Fatores de virulência e infecção epitelial "*in vitro*" de biofilmes simples e mistos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

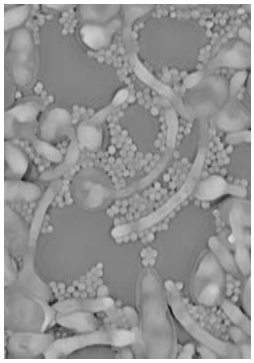
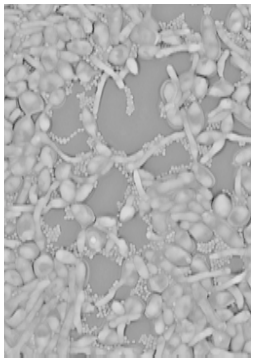
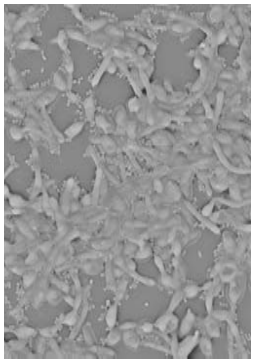
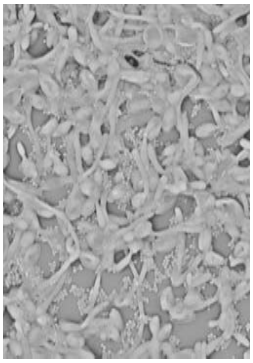
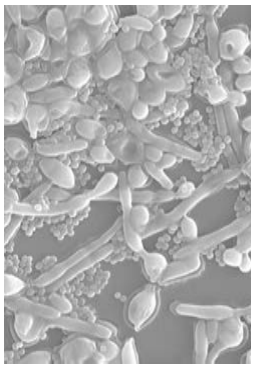
Resumo

O objetivo do presente estudo "*in vitro*" foi avaliar a interação entre os micro-organismos *C. albicans*, *S. aureus* sensível (MSSA) e resistente (MRSA) à meticilina com relação a alguns dos seus principais fatores de virulência. Estes fatores foram analisados considerando os micro-organismos isoladamente e em culturas mistas. Foi verificada a interação entre esses micro-organismos através da contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL), análise da atividade metabólica por meio do ensaio XTT e quantificação da biomassa total por meio do corante cristal violeta nos tempos de 90 minutos, 12, 24 e 48 horas. Para análise da produção de proteinase (SAP) e fosfolipase (PL-C), kits fluorimétricos foram utilizados. A estrutura dos biofilmes foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Culturas simples e mistas dos micro-organismos também foram utilizadas para infectar um epitélio oral humano reconstituído (EOHR). A capacidade de colonização e invasão foi avaliada após 24 horas utilizando a técnica de hibridização "*in situ*" (PNA-FISH). A avaliação do dano causado pelos micro-organismos ao tecido foi realizada por quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Técnicas moleculares (RT-qPCR) foram empregadas para quantificação do número de micro-organismos colonizando o epitélio e também para avaliação da expressão de genes de virulência. A expressão gênica foi avaliada em superfície biótica (EOHR) e abiótica (placa de poliestireno de 24 poços) para culturas simples e mistas dos micro-organismos. Os resultados dos ensaios de quantificação foram analisados utilizando ANOVA a dois critérios com teste "*post-hoc*" de

Tukey ($\alpha = 0,05$), enquanto os dados de atividade enzimática foram analisados por ANOVA a um critério com correção de Welch seguido pelo teste de Games-Howell. Os resultados da expressão gênica foram analisados por meio de ANOVA a um critério seguida de Tukey para os resultados que assumiram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade ou ANOVA com correção de Welch seguida por Games-Howell nos casos heterocedásticos. Os dados de liberação de LDH também foram analisados por meio de ANOVA a um critério seguido de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados evidenciaram que os micro-organismos *C. albicans*, MSSA e MRSA foram capazes de aderir e formar biofilme em culturas simples e mistas. De maneira geral, os biofilmes mistos mostraram um comportamento evolutivo, ao longo do tempo, em termos de número de células, atividade metabólica e biomassa total. Quando *C. albicans*, MSSA e MRSA foram cultivados em coculturas, ambas as enzimas (SAP e PL-C) foram produzidas. Imagens de MEV revelaram uma extensa adesão das bactérias às hifas da *C. albicans*. Os três patógenos foram capazes de colonizar o EOHR. Nas infecções simples, *C. albicans*, além de colonizar, também foi capaz de invadir as camadas epiteliais, enquanto nas infecções bacterianas os micro-organismos permaneceram apenas na superfície. Em infecções mistas, as bactérias estavam presentes em camadas mais profundas e o tecido apresentou grande destruição. Todos os genes de virulência avaliados foram expressos em culturas simples e mistas durante a infecção dos tecidos e também durante a formação de biofilmes em superfície abiótica. De maneira geral, não houve diferenças significativas entre a expressão gênica de biofilmes/infecções simples e a expressão gênica de biofilmes/infecções mistas, com exceção dos genes das bactérias em superfície abiótica, que foram sub-regulados em biofilmes mistos. Foi possível observar que *C. albicans*, MSSA e MRSA coexistiram em biofilmes sem antagonismo, e com um aparente efeito sinérgico, com as bactérias aderidas preferencialmente às hifas de *C. albicans*. Além disso, devido à produção de enzimas degradativas, ao melhor acesso bacteriano à camadas mais profundas do

tecido e também ao maior dano tecidual, é provável que esses micro-organismos apresentem maior patogenicidade quando associados.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Staphylococcus aureus*; biofilmes; fosfolipase tipo C; proteinases; coinfecção.

Abstract

Zago CE. Virulence factors and "*in vitro*" epithelial infections by single and dual biofilms of *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

Abstract

The aim of this study was to evaluate, "*in vitro*", the interaction between *C. albicans* and methicillin- susceptible (MSSA) and resistant (MRSA) *S. aureus* in relation to some of their major virulence factors. These factors were analyzed considering the three microorganisms in single and dual cultures. The interaction between these microorganisms was evaluated by counting colony-forming units (CFU/mL), analysis of metabolic activity by the XTT assay and quantification of the total biomass by crystal violet dye at 90 minutes, 12, 24, and 48 hours. To analyze the production of proteinase (SAP) and phospholipase (PL-C), fluorometric kits were used. The structure of the biofilms was acessed by scanning electron microscopy (SEM). Further, single and dual cultures of microorganisms were used to infect a reconstituted human oral epithelium (RHOE). The pattern of colonization and invasion of the RHOE was evaluated after 24 hours using the in situ hybridization technique (PNA-FISH). The damage caused by microorganisms in the tissue was evaluated by quantification of the lactate dehydrogenase enzyme (LDH) released. Molecular techniques (RT-qPCR) were also used to quantify the number of microorganisms colonizing the epithelium and to evaluate the expression of virulence genes. Gene expression was evaluated in biotic (RHOE) and abiotic (24-well polystyrene microplate) surfaces for single and dual cultures. The results from quantification assays were compared using two-way ANOVA with Tukey post-hoc test, while data from enzymatic activities were analyzed by one-way Welch-ANOVA followed by Games-Howell post hoc test. The results of gene expression were analyzed by one-way

ANOVA with Tukey for data satisfying the assumptions of normality and homoscedasticity or one-way Welch-ANOVA followed by Games-Howell for heteroscedastic data. LDH results were also analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey ($\alpha = 0.05$). *C. albicans*, MSSA and MRSA were able to adhere and form biofilm in both single and dual cultures. In general, the dual biofilms showed an evolutive behavior over time in terms of number of cells, metabolic activity, and total biomass. When *C. albicans*, MSSA, and MRSA were in a co-culture, both enzymes (SAP and PL-C) were produced. SEM images revealed an extensive adherence of bacteria to hyphal elements of *C. albicans*. All pathogens were able to colonize the RHOE surface in single and dual co-infections. Single infections of *C. albicans* were also able to invade epithelial layers, while bacteria in single infections remained only on the tissue surface. In dual-infections, bacteria were present in deeper layers and the tissue showed an increased destruction. All genes evaluated were expressed in single and dual cultures during tissue infection and also during biofilm formation on abiotic surface. In general, there were no significant differences between the expression of single biofilms/infections and the expression of dual biofilms/infections, with exception of the bacteria genes on abiotic surface, which were down-regulated in dual biofilms. Was possible to observe that *C. albicans*, MSSA and MRSA co-exist in biofilms without antagonism and with an apparent synergistic effect, with bacteria cells preferentially associated to *C. albicans* hyphal forms. Furthermore, due to the production of degradative enzymes, to the better bacterial access into the deeper layers of tissue, and also to the increased tissue damage, it is likely that these microorganisms may have a greater pathogenicity when associated.

Keywords: *Candida albicans*; *Staphylococcus aureus*; biofilms; phospholipase C; proteases; co-infection.

Sumário

1 Introdução.....23

2 Revisão da Literatura.....31

3 Proposição.....78

4 Material e Método.....80

4.1 Material.....81

4.2 Instrumentos.....84

4.3 Equipamentos.....85

4.4 Métodos.....86

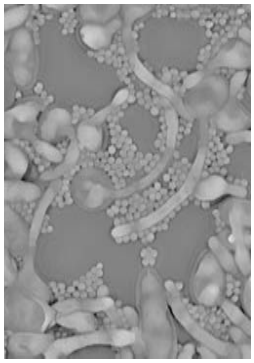
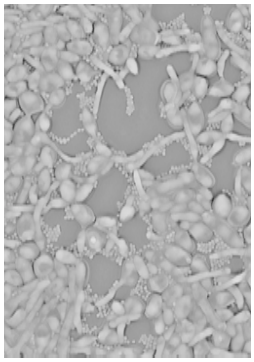
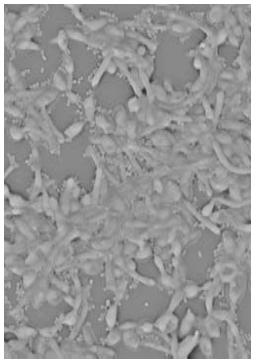
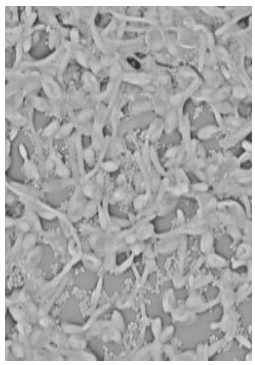
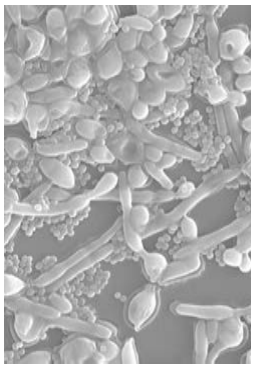
4.5 Metodologia estatística.....110

5 Resultado.....112

6 Discussão.....128

7 Conclusão.....142

Referências.....144

Introdução

1 Introdução

Atualmente, avanços nas pesquisas têm proporcionado o aumento da identificação e caracterização de uma vasta diversidade microbiana colonizando diferentes nichos. O ambiente orofaríngeo é um dos nichos mais complexos do corpo humano, sendo colonizado por uma diversidade de micro-organismos, incluindo fungos e bactérias[49,65]. Esses micro-organismos, altamente inter-relacionados, apresentam a capacidade de se organizar na forma de biofilmes, definidos como comunidades complexas de células microbianas, aderidas a uma superfície e encapsuladas por uma matriz extracelular protetora composta, principalmente, de polissacarídeos[21,28]. Devido a sua constituição, os biofilmes caracterizam um ambiente protegido e nutricionalmente rico, propício para sobrevivência e proliferação dos micro-organismos[26,35]. Os biofilmes constituem um desafio para medicina humana, tendo sido estimado que aproximadamente 65% de todas as infecções microbianas estão relacionadas com a sua presença[23,27,28]. A relevância clínica da presença dos biofilmes nas infecções humanas relaciona-se ao fato dessa estrutura complexa apresentar características fenotípicas distintas das células no estado planctônico, pois são mais tolerantes aos agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro[23,34]. Além disso, a capacidade de produção de biofilme apresentada por diferentes gêneros de bactérias e fungos está diretamente relacionada à virulência destes micro-organismos e à sua capacidade de causar infecções. Tem sido observado que espécies fúngicas e bacterianas, quando testadas em modelos de biofilmes, exibiram maior tolerância a antimicrobianos sistêmicos e tópicos, como fluconazol, nistatina e digluconato de clorexidina[20,21,84].

Além das superfícies do corpo humano, os micro-organismos possuem a capacidade de se aderir e formar biofilmes sobre superfícies abióticas[6,10,20,24,82,83,90]. Dentre estas superfícies, destacam-se aquelas das próteses dentárias, pois vários estudos relataram a sua contaminação por cepas de patógenos importantes, como *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp.[10,38,70,73,90,94]. O biofilme aderido às próteses acaba se tornando um reservatório de patógenos[1,70,82,83], favorecendo sua disseminação. Tem sido verificado que os micro-organismos podem se desprender do biofilme, se dispersar nas secreções salivares, sendo aspirados e disseminados para outros locais do corpo[82,83], causando, assim, infecções sistêmicas, como a fungemia[63] e a pneumonia aspirativa[88,91]. A presença de biofilme sobre as próteses pode também causar a colonização nasofaríngea persistente[48,71], levando ao aparecimento de infecções recorrentes[81] e de resistência microbiana[91].

Além da capacidade destes micro-organismos formarem biofilmes simples, ou seja, de uma única espécie, a interação entre diferentes micro-organismos em um biofilme tem sido relatada na literatura[3,11,15-18,36,41,50,62,64,68,78,92]. Os micro-organismos apresentam a capacidade de se aglutinar e interagir, promovendo uma melhor adesão e o desenvolvimento de um biofilme polimicrobiano, que resulta em uma infinidade de interações complexas e mecanismos de sinalização interespécies[26,37,97]. Tem sido estimado que biofilmes polimicrobianos apresentam um impacto mais relevante nas infecções do que os monomicrobianos, pois estão relacionados com maiores índices de mortalidade[15,16,68,76]. Atualmente, um biofilme polimicrobiano que tem se destacado devido à sua elevada patogenicidade[15-18,68,76] e alta resistência aos antimicrobianos[35,36,78] é aquele formado pelo patógeno eucariótico *Candida albicans* e pelo patógeno procariótico *Staphylococcus aureus*.

C. albicans, espécie de *Candida* de maior virulência[12,13] e prevalência[73], vive como comensal em diversas áreas do organismo da maioria dos indivíduos saudáveis[12,37,42]. No entanto, sob determinadas condições ambientais, esse micro-organismo oportunista se

transforma em um patógeno, podendo colonizar mucosas, invadir tecidos e causar infecções[12,13,42]. *C. albicans* tem a capacidade de se desenvolver em uma variedade de formas morfológicas, que variam desde células leveduriformes (blastóporos) comensais até células alongadas com a forma de tubo, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)[87]. Este polimorfismo celular representa uma transição para a patogenicidade das células de *C. albicans*, pois uma vez caracterizadas na forma de hifas, as barreiras epiteliais protetoras do hospedeiro podem ser superadas, favorecendo o aparecimento de infecções[87]. A infecção da cavidade bucal associada à *C. albicans* é denominada candidose bucal, infecção fúngica mais comum entre humanos, principalmente idosos, imunossuprimidos e usuários de próteses totais[4,10,37,73]. A candidose bucal, quando associada à utilização de próteses removíveis, parciais ou totais, é denominada estomatite protética, lesão bucal mais comumente observada em usuários de próteses removíveis[10,40,73]. Além disso, em indivíduos imunocomprometidos, esta infecção bucal pode se estender para o trato gastrointestinal superior ou para a corrente sanguínea, desencadeando fungemia[63], infecção sistêmica que acarreta mortalidade em até 79% dos casos[63]. Devido à proliferação fúngica na mucosa esofágica, a candidose bucal pode promover dificuldade de deglutição (disfagia), levando a desnutrição, prolongamento de estados hospitalares e baixa resistência imunológica[4,40].

Tem sido estimado que 27% das fungemias causadas por *C. albicans* são, na verdade, de origem polimicrobiana, sendo *S. aureus* considerado o terceiro micro-organismo mais frequentemente isolado em interação com essa espécie de *Candida*[44]. O micro-organismo *S. aureus*, apesar de ter sido considerado um colonizador transiente da microbiota oral[24,38,82], cada vez mais evidências apontam que este micro-organismo além de ser um isolado comum da cavidade oral de crianças e adultos saudáveis[56,82,83], também tem sido reconhecido como um dos principais patógenos humanos, devido à sua elevada virulência e por apresentar capacidade de desenvolver resistência às terapias medicamentosas[19,38]. A

associação entre a colonização do meio bucal por este micro-organismo e a presença de próteses dentárias faz com que os usuários de próteses se tornem ainda mais suscetíveis às infecções por *S. aureus*[10,70,76,82]. A prevalência desta bactéria em usuários de próteses sem estomatite protética é de 34,4%[70], sendo esta prevalência ainda maior (49,5%) em usuários que apresentam estomatite protética[10]. Algumas cepas de *S. aureus*, devido a alterações em sua parede celular relacionadas à ativação e ao aumento de síntese de alguns componentes, desenvolveram resistência a vários agentes antibacterianos, e foram denominadas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA)[46]. Embora o mecanismo pelo qual as cepas de MRSA tornam-se resistentes aos antibióticos não ser completamente compreendido, esta alteração parece estar relacionada à presença de uma proteína adquirida chamada "*penicillin-binding protein 2a*" (PBP2a), que é codificada pelo gene de resistência à meticilina (*mecA*) e menos afetada pelos antibióticos β–lactâmicos[33,46]. Estudos evidenciaram que entre os isolados clínicos de *S. aureus*, o MRSA tem sido encontrado coloninzando preferencialmente a superfície de próteses dentárias com uma prevalência que varia entre 10 a 19%[58,90], sendo esta prevalência mais alta relacionada a usuários de idade mais avançada ou imunocomprometidos[19,38,58,82,90], resultando no aparecimento de sérias infecções sistêmicas, especialmente nestes pacientes[91], e em elevadas taxas de mortalidade[22,91]. Dentre as infecções sistêmicas relacionadas ao *S. aureus*, a pneumonia aspirativa tem sido considerada uma das mais preocupantes[91] devido à elevada taxa de mortalidade entre pacientes idosos[51,54].

Além da alta prevalência e capacidade de causar infecções severas, tanto locais e sistêmicas, os micro-organismos *C. albicans* e *S. aureus* apresentam também a capacidade de formar uma aliança mútua, promovendo um sinergismo para as espécies[15-18,35,36,41,62,64,68]. Em uma série de estudos "*in vivo*" em animais[15-18,68] foi demonstrado que *C. albicans* exerce um efeito potencializador do grau de virulência de *S. aureus*, aumentando significativamente o grau de mortalidade dos animais. Da mesma forma, recentes estudos demonstraram uma

intensa interação entre as células bacterianas e fúngicas quando sob a forma de biofilme misto[35,36,41,64]. As células circulares de *S. aureus* se aderem de forma acentuada às hifas de *C. albicans*, formando um aglomerado misto polimicrobiano, tanto nas camadas mais superficiais[35,64,66] do biofilme quanto naquelas mais profundas[64,66]. Além disso, Harriott, Noverr[35] observaram que, em comunidade polimicrobiana, os produtos resultantes do metabolismo das células de *C. albicans* durante o processo de formação de biofilme foram utilizados pelas cepas de *S. aureus*, aumentando seu crescimento e desenvolvimento em biofilme[35]. Tem sido relatado também um aumento da tolerância destes micro-organismos à diferentes agentes antimicrobianos, quando presentes em comunidades mistas. A presença da matriz extracelular de *C. albicans* em biofilmes de *S. aureus* resultou em aumento da resistência bacteriana ao antibiótico vancomicina, demonstrando o efeito sinérgico protetor entre estes micro-organismos[35].

Alguns fatores de virulência identificados nestes micro-organismos podem ser responsáveis por esse sinergismo infeccioso. Além disso, é possível que, em comunidades polimicrobianas, os fatores de virulência específicos de cada espécie sejam modulados e potencializem a patogenicidade dos biofilmes polimicrobianos[76,78]. Entre os atributos de virulência, a adesão dos micro-organismos, tanto às superfícies bióticas ou abióticas, quanto de um micro-organismo ao outro (coagregação), é um pré-requisito para o desenvolvimento de biofilmes e consequentemente para o estabelecimento de infecções polimicrobianas[26,65]. Outro fator de virulência desses patógenos é a habilidade de se desenvolver na forma de biofilme[20,28], com variação em relação à produção, composição e atividade metabólica[80]. A atividade metabólica de um biofilme é importante em termos de patogenicidade, pois é indicativa de crescimento e reprodução celular, produção de substâncias tóxicas e maior tolerância antimicrobiana[35,36]. Dessa maneira, a capacidade de produção de biofilme está

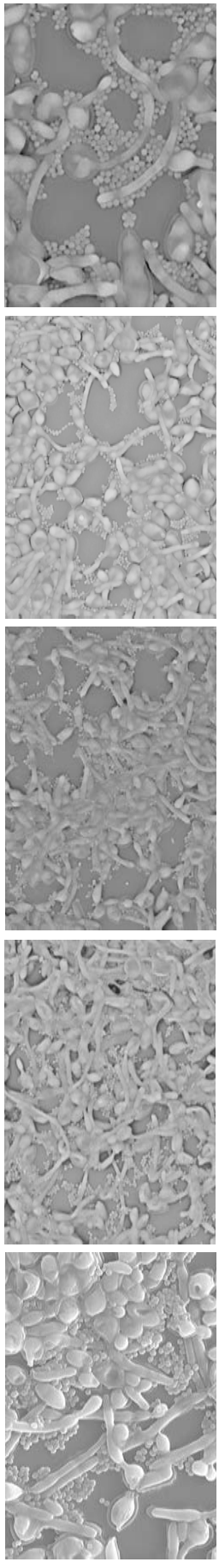
diretamente relacionada à virulência destes micro-organismos e à sua capacidade de causar infecções.

Outro fator relacionado à virulência destes micro-organismos é a sua capacidade de secretar enzimas hidrolíticas como proteases (SAP) e fosfolipases (PL)[43,72,77,96]. A secreção dessas enzimas está diretamente envolvida com o processo de colonização e, consequentemente, de infecção[74,75], uma vez que, por meio do dano causado à mucosa do hospedeiro, a invasão do epitélio é facilitada. Os papéis específicos dessas duas enzimas no processo de colonização e infecção apresentam sutis diferenças. Em geral, as SAPs induzem a degradação de uma ampla variedade de proteínas do hospedeiro[43,52,53] ao passo que as PLs apresentam a capacidade de atacar e digerir fosfolipídios comuns em todas as membranas celulares[32]. Desta forma, essas enzimas destroem as principais barreiras de defesa da mucosa oral, favorecendo a destruição celular e invasão tecidual.

A capacidade que *C. albicans* apresenta de se alternar morfologicamente entre leveduras e hifas é outro fator de virulência determinante em infeçcões, uma vez que, na forma de hifas, invadem as barreiras epiteliais protetoras do hospedeiro. Neste estado morfológico, os fungos também são capazes de expressar algumas adesinas como ALS3 (“*agglutinin-like-sequence*”)[9,25] e HWP1 (“*hyphal wall protein*”)[25] que facilitam o reconhecimento, a adesão e a colonização das células do hospedeiro. Klotz et al.[45] identificaram a ALS3 como importante adesina para a coadesão interespécies em biofilmes polimicrobianos. De fato, Peters et al.[66], utilizando um modelo de camundongos “*ex vivo*”, constataram que a adesina ALS3 foi um receptor de hifas relevante no processo de adesão de *S. aureus*. Como a ALS3, a adesina HWP1 também teve seu papel confirmado por alguns autores[12,25,93] na adesão das hifas às células epiteliais e, consequentemente, na virulência de *C. albicans*.

O arsenal de fatores de virulência de *S. aureus* também é extensivo, tanto em produtos estruturais quanto também em produtos secretados, ambos desempenhando papel significativo na patogênese da infecção desses micro-organismos[33]. Entre os atributos de virulência de *S. aureus*, a expressão de algumas proteínas de superfície como clfA e clfB ("*clumping factors*") são cruciais para o sucesso de sua patogênese[31]. Essas proteínas são consideradas importantes nas infecções, pois estão relacionadas à adesão dos cocos às células do hospedeiro[33]. A proteína clfB promove a adesão de *S. aureus* à queratina 10, a qual é o principal componente das células epiteliais escamosas dos tecidos hospedeiros[14,55]. Essa proteína também interfere de forma significativa na formação de biofilmes por *S. aureus*[2]. Por outro lado, a proteína clfA tem sido relacionada não apenas à adesão de *S. aureus*[33], mas também à sua capacidade de impedir o processo de fagocitose por macrófagos do organismo hospedeiro[31,59].

Apesar de nas últimas décadas ter havido um aumento nas pesquisas com o intuito de se avaliar diferentes fatores de virulência em cepas de *C. albicans* e *S. aureus*, pouco é conhecido sobre o comportamento de comunidades mistas destes micro-organismos. Além disso, estudos genômicos e proteômicos demostraram expressão diferencial por cada uma das espécies quando cultivadas em biofilmes mistos, estabelecendo a ocorrência de um processo dinâmico e interativo entre estes dois agentes patogênicos[78]. Portanto, o entendimento dos mecanismos de adesão e de sinalização envolvidos em interações fúngicas-bacterianas podem conduzir ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para modificar a colonização microbiana e, assim, controlar o desenvolvimento da doença polimicrobiana.



Revisão da Literatura

2 Revisão da Literatura

Com objetivos didáticos, a revisão da literatura abordará três aspectos separadamente: o primeiro fará referência aos trabalhos relacionados à biofilmes fúngicos, o segundo enfocará os estudos relacionados à biofilmes bacterianos e o terceiro abordará os estudos relacionados à interação fúngica e bacteriana no processo patogênico.

2. 1 Biofilmes fúngicos

Embora a expressão dos genes de *SAP* ("*secreted aspartyl proteinase*") ter sido extensivamente caracterizada em condições de crescimento laboratorial, as funções individuais e coletivas de SAP durante a colonização e infecção humana por *C. albicans* ainda não tinham sido completamente elucidadas no final da década de 1990. Desta forma, em 1999, Naglik et al.[52] desenvolveram um procedimento seguro e confiável para detectar RNAm de *C. albicans* na saliva de pacientes com candidose oral e naqueles pacientes onde a presença do fungo permanecia assintomática. Para o estudo, 25 pacientes foram recrutados e divididos em três grupos experimentais (1- pacientes com ausência de *Candida* na saliva; 2- pacientes portadores assintomáticos de *Candida*; 3- pacientes com candidose oral estabelecida). Duas amostras da saliva estimulada de cada paciente foi coletada, uma delas utilizada para extração de RNA e outra para quantificar o número de *Candida* por mililitro de saliva (UFC/mL). O protocolo da reação em cadeia da polimerase em tempo real ("*Real Time Polymerase Chain Reaction"* – RT-qPCR) foi utilizado para determinar quais genes da família *SAP* (*SAP1* a *SAP7*) seriam expressos durante a colonização e infecção da cavidade oral. Subfamílias de *SAP2*, *SAP4*, *SAP5* e *SAP6* foram os genes predominantemente expressos na cavidade oral de pacientes portadores assintomáticos de *C. albicans* e pacientes com candidose oral. *SAP4*,

SAP5 e *SAP6* foram detectados em todos os pacientes, sendo *SAP1* e *SAP3* observados apenas naqueles com candidose oral. A expressão de *SAP7*, a qual ainda não havia sido demonstrada sob condições laboratoriais, foi detectada em várias amostras dos pacientes. Além disso, todos os genes de *SAP* foram expressos simultaneamente em alguns pacientes com candidose oral. Dessa forma, os autores desse estudo pioneiro concluíram que o envolvimento de *SAP* na patogênese "*in vivo*" de *C. albicans* pode não ser necessariamente inferido a partir do convencional crescimento e análises laboratoriais.

O efeito do gene *HWP1* na patogenicidade de *C. albicans* foi investigado por Tsuchimori et al.[93], em 2000. Os autores avaliaram a virulência e morfologia de cepas de *C. albicans* mutantes deficientes de *HWP1* em infecções hematogênicas desenvolvidas em camundongos e a interação entre os mutantes e células endoteliais humanas. Além da cepa parental, duas cepas mutantes (com deficiência de um ou dois alelos de *HWP1*) foram utilizadas para infecção intravenosa dos camundongos. Os camundongos infectados por via intravenosa com as cepas mutantes sobreviveram em média 14 dias, ao passo que os camundongos infectados com a cepa parental sobreviveram apenas 3,5 dias. Após o primeiro dia de infecção, todas as cepas produziram níveis semelhantes de infecção nos rins, baço e sangue dos camundongos. No entanto, depois do 2° e 3° dia pós-infecção, houve uma diminuição significativa do número de micro-organismos nos rins dos camundongos infectados com as cepas mutantes. Este achado sugere que a cepa mutante em *HWP1* apresenta capacidade normal para iniciar infecções, no entanto, apresenta capacidade deficiente para manter essas infecções. As cepas mutantes, além de formarem quantidades menores de hifas nos rins dos camundongos também apresentaram menores danos às células endoteliais. Desta forma, os autores concluíram que o gene *HWP1* é importante para o desenvolvimento "*in vivo*" de hifas e, consequentemente, para a patogenicidade de *C. albicans.*

Ainda, no ano 2000, Ghannoum[32] por meio de uma revisão de literatura, investigou o papel das fosfolipases extracelulares (PL) como um fator de virulência na patogênese fúngica. Além disso, o autor forneceu uma descrição detalhada dos métodos moleculares e bioquímicos utilizados para delinear o papel dessa enzima hidrolítica na virulência de alguns micro-organismos, sobretudo na virulência de *C. albicans*. O autor aborda também em modelos de camundongos o desenvolvimento de cepas mutantes deficientes de *PL*, clinicamente relevantes no processo de candidose. Atenuação da virulência de *C. albicans* foi demonstrada quando os mutantes foram utilizados. Os camundongos infectados com cepa parental apresentaram infecção abdominal generalizada, e consequentemente, taxas de mortalidade significativamente maiores quando comparado aos camundongos infectados com cepas mutantes deficientes de *PL*. Além disso, estudos que utilizaram imunomarcações associadas a microscopia revelaram que *C. albicans* secreta PL durante o processo infeccioso, e que essa secreção é concentrada na extremidade dos elementos invasivos (hifas). Desta forma, os dados dessa revisão indicam que a PL é essencial para a virulência de *C. albicans*. Embora os mecanismos através dos quais a PL modula a virulência fúngica ainda estejam sob investigação, os dados iniciais sugerem que os danos e lise às células dos hospedeiros são os principais mecanismos que contribuem para a virulência de *C. albicans*. De acordo com os autores, devido a importância das PLs na virulência fúngica, o desafio seguinte seria a utilização destas enzimas como possíveis alvos terapêuticos.

O biofilme fornece aos micro-organismos um local protegido da ação de tratamentos e assim favorece uma fonte de infecção persistente. Desta forma, Chandra et al.[21], em 2001, avaliaram o desenvolvimento dos biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans* (cepas GDH-2346 e M-61) sobre amostras de polimetilmetacrilato e silicone elastomérico. A partir das espécies de *Candida* foi demonstrada que a formação dos biofilmes acontece em

três fases de desenvolvimento distintas. Essas fases de crescimento transformam blastósporos aderentes à superfície em comunidades celulares bem definidas envoltas em matriz de polissacarídeo. A microscopia de fluorescência e a microscopia confocal de varredura laser mostraram que os biofilmes de *C. albicans* apresentaram arquitetura altamente heterogênea, composto de elementos celulares e não celulares (matriz de polissacarídeos). Em ambos os modelos, a resistência fúngica de células cultivadas aumentou com o processo de formação do biofilme. A expressão de genes de aglutinina, que codificam uma família de proteínas envolvidas na adesão às superfícies, foi regulada diferencialmente entre células planctônicas e os biofilmes formados. Além disso, a formação de biofilme de *C. albicans* foi comparada a cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Observou-se que a capacidade de *C. albicans* para formar biofilmes é marcadamente diferente de *S. cerevisiae*. Este último é capaz de aderir às superfícies das biopróteses, mas não consegue progredir para a formação de biofilme maduro, caracterizado pela presença da matriz extracelular. Além disso, foi verificado que a resistência fúngica do *S. cerevisiae* não aumentou com o tempo.

Ainda em 2001, Chandra et al.[20] desenvolveram um modelo reprodutível de biofilme de *C. albicans* em prótese para determinar a suscetibilidade de isolados do micro-organismo a quatro agentes antifúngicos (nistatina, anfotericina, fluconazol e clorexidina). Inicialmente, foi obtida uma suspensão celular de dois isolados de *C. albicans*, sendo um de paciente com estomatite protética e um de paciente HIV-positivo com candidose orofaríngea. Para a formação do biofilme, uma alíquota da suspensão celular foi aplicada nas superfícies de um corpo de prova de resina acrílica. A suscetibilidade de *C. albicans* presente no biofilme foi comparada à de células planctônicas desse micro-organismo. Houve 50% de redução da atividade metabólica do biofilme quando os antifúngicos anfotericina, nistatina, clorexidina e fluconazol foram aplicados nas concentrações de 8 µg/mL, 16 µg/mL, 128 µg/mL e superior a 64 µg/mL, respectivamente. Entretanto, as células planctônicas de *C. albicans* foram

suscetíveis aos agentes antifúngicos, com 50% de redução da atividade metabólica para as concentrações de 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL e 0,5 µg/mL dos antifúngicos anfotericina B, nistatina, clorexidina e fluconazol, respectivamente. Os autores concluíram que, comparadas às células planctônicas, as células de *C. albicans* associadas ao modelo de biofilme em prótese apresentaram resistência aos antifúngicos mais frequentemente utilizados para o tratamento da estomatite protética.

Al-Fattani, Douglas[5], em 2006, analisaram quimicamente o material da matriz extracelular extraída de biofilmes formados por isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A matriz, de ambas as espécies, continha carboidratos, proteínas, hexosaminas, ácido urônico e fósforo. No entanto, o principal componente da matriz do biofilme de *C. albicans* foi a glicose (32%), enquanto o principal constituinte da matriz do biofilme formado por *C. tropicalis* foi hexosaminas (27%). Os autores, ainda investigaram se biofilmes formados pelas espécies de *Candida* poderiam se desprender das superfícies plásticas através da degradação de polímeros da matriz por diferentes enzimas (proteinase K, protease XIV, DNase 1, N-acetilglucosaminidase, quitinase, lipase tipo VII, fosfolipase A2 e liticase). Os biofilmes de *C. albicans* foram desprendidos mais facilmente com o tratamento da enzima liticase quando comparado aos biofilmes de *C. tropicalis*. Biofilmes de *C. albicans* também foram parcialmente desprendido com o tratamento por proteinase K, quitinase, DNase I, e b-N-acetilglucosaminidase, enquanto o biofilme de *C. tropicalis* foi afetado apenas pela lipase tipo VII e pela quitinase. A fim de investigar um possível papel da matriz na resistência desses biofilmes aos agentes antifúngicos, duas condições distintas (uma condição estática e sob agitação) de formação dos biofilmes foram utilizadas. Os biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sob agitação produziram maior quantidade de matriz e foram significativamente mais resistente à anfotericina B do que aqueles desenvolvidos sob condição estática. Biofilmes de *C. tropicalis* sintetizaram uma grande quantidade de matriz,

mesmo quando desenvolvidos sob condições estáticas e foram completamente resistentes tanto ao fluconazol quanto à anfotericina B. A avaliação da suscetibilidade à antimicrobianos também foi avaliada em biofilmes mistos de *C. albicans* e *Staphylococcus epidermidis*, em condições estáticas e sob agitação. Para isto, duas estirpes bacterianas foram utilizadas (uma produtora de matriz e outra mutante que não era capaz de produzir matriz). Os biofilmes mistos de *C. albicans* com a cepa bacteriana produtora de matriz foram completamente resistentes ao fluconazol e à anfotericina B, independentemente de terem sido desenvolvidos estaticamente ou sob agitação. Por outro lado, os biofilmes mistos com a cepa não produtora de matriz só apresentaram completa resistência quando desenvolvidos sob agitação. Os resultados demonstraram que a matriz dos biofilmes pode proporcionar uma contribuição significativa para resistência à agentes antimicrobianos em biofilmes de *C. albicans*, especialmente sob condições similares àquelas encontradas em infecções "*in vivo*" de cateteres. Além disso, a composição da matriz é um importante determinante na resistência fúngica.

A adesão de isolados clínicos de *C. albicans*, obtidos da cavidade oral de pacientes com e sem sinais clínicos de estomatite protética, foi analisada por Lyon, Resende[47], em 2006. Para a realização do estudo, 99 indivíduos, portadores de próteses totais, foram diagnosticados em função da presença de estomatite protética. Quarenta e quatro pacientes foram portadores da infecção e 55 apresentaram a mucosa palatina saudável. Os resultados do experimento demonstraram que as cepas de *C. albicans* obtidas de pacientes com estomatite protética foram significantemente mais aderentes às células buco-epiteliais e produziram maior quantidade de enzimas quando comparadas aos isolados de pacientes com a mucosa saudável. Além disso, foi observado que o fluconazol diminui a capacidade de aderência dos isolados clínicos, independentemente de sua origem ser de pacientes com ou sem estomatite protética. Uma correlação positiva também foi encontrada entre maior capacidade de adesão e

maior nível de produção enzimática. Os autores concluíram que a adesão dos isolados e a produção de enzimas específicas são fatores de virulência de *Candida* que, associados à suscetibilidade do indivíduo, podem favorecer o aparecimento da estomatite protética.

Análise das características morfogênicas e moleculares, que afetam a virulência fúngica nas infecções de córneas humanas, foi objetivo do estudo de Hua et al.[39], em 2009. Para isto, dois isolados clínicos de *C. albicans* foram utilizados (SC5314 isolada de pacientes com candidose generalizada; VE175 isolada de pacientes com ceratite ocular) juntamente com uma cepa mutante (DSY459) deficiente na secreção de proteinases (SAP4, SAP5 e SAP6). O crescimento cinético, "*in vitro*", de suspensões padronizadas dos dois isolados clínicos foi comparado utilizando o ensaio de filamentação e análise de microarray. Além disso, a virulência dessas cepas foi comparada através da quantificação de penetração das hifas depois de 1 e 3 dias de infecção. Para isto, um modelo "*ex vivo*" de 36 córneas humanas foi utilizado. Adicionalmente, uma comparação da virulência dos isolados clínicos foi realizada com a cepa mutante. A cepa de *C. albicans* SC5314 apresentou alta produção de hifas "*in vitro*" e, consequentemente, causou maior invasão das córneas humanas. Por outro lado, a cepa de VE175 demonstrou produção limitada das formas filamentosas e invasividade das córneas prejudicada. Entre os 6655 genes de *C. albicans*, detectados pelo ensaio de microarray, 601 (9,03%) genes da cepa SC5314 foram regulados de maneira diferente [2 vezes mais ($\rho<0,05$)] quando comparado aos genes da cepa VE1175. Genes *SAP5*, *SAP6* e alguns outros genes envolvidos na filamentação fúngica foram sobre-regulados na cepa SC5314. A cepa mutante DSY459 apresentou filamentação e penetração intermediária das córneas humanas, quando comparado aos isolados clínicos. Desta forma, os autores concluíram que os genes envolvidos na filamentação fúngica podem contribuir para diferenças na virulência entre linhagens de *C. albicans*. Adicionalmente, a patogenicidade de *C. albicans* é dependente da transfomação morfogênica de leveduras em hifas.

Silva et al.[79], em 2009, tiveram como objetivo caracterizar os biofilmes produzidos por 18 isolados clínicos de *C. parapsilosis, C. tropicalis* e *C. glabrata*. A capacidade de formação de biofilme dos isolados clínicos dessas espécies foi avaliada por coloração com cristal violeta. As características da estrutura morfológica dos biofilmes foram analisadas por microscopia electrônica de varredura (MEV), e a composição de matriz do biofilme foi analisada pela composição de proteína e de hidratos de carbono. Todas as espécies de *Candida* foram capazes de formar biofilmes, embora *C. glabrata* tenha produzido biofilme menos robusto comparado a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Foi evidente que a produção de biofilme de *C. parapsilosis* foi altamente dependente da cepa, uma característica não observada nas espécies de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. As imagens de MEV revelaram diferenças estruturais dos biofilmes em relação à morfologia celular e arranjo espacial. As matrizes dos biofilmes de *C. parapsilosis* apresentaram grandes quantidades de hidratos de carbono e menor quantidade de proteína, enquanto que as matrizes dos biofilmes de *C. tropicalis* apresentavam baixas quantidades de hidratos de carbono e proteínas. A matriz do biofilme de *C. glabrata* apresentou elevada quantidade de proteínas e carboidratos. O presente trabalho demonstrou que a capacidade de formação do biofilme, a estrutura e a composição da matriz são altamente dependentes da espécie.

Muitos estudos têm mostrado que a expressão de atributos de virulência é maximizado quando os micro-organismos estão associados na forma de biofilme. Diante disto, Taniguchi et al.[89], em 2009, avaliaram a atividade fosfolipásica de *C. albicans* em estado planctônico e em biofilme. Para isso, suspensões padronizadas (OD 520 nm = 0,38) da cepa de *C. albicans* SC5314 foram transferidas para tubos de cultura e para placas de poliestireno de 12 poços, contendo meio específico, e incubados a 37°C por 72 horas para formação das culturas planctônicas e dos biofilmes. O sobrenadante das culturas celulares e dos biofilmes foram utilizados para o teste colorimétrico de hidrólise da fosfatidilcolina em

condições neutra e ácida. Além disso, as células do "*pellet*" das culturas planctônicas e as células dos biofilmes aderidos foram utilizados para o teste de quantificação de biomassa total, e esses valores de biomassa, foram utilizados para normalizar os dados da atividade enzimática. Os resultados mostraram que apesar dos biofilmes terem maior biomassa, culturas planctônicas de *C. albicans* em 72 horas secretam maior quantidade de fosfolipase, tanto em pH neutro (6,42 x mais) como em pH ácido (3,85 x mais), quando comparado a quantidade de fosfolipase secretada pelos biofilmes. Desta forma, os resultados deste estudo devem ser levados em conta ao comparar o potencial patogênico desses dois fenótipos de crescimento.

Rajendram et al.[69], em 2010, objetivaram investigar a formação de biofilme e a secreção de enzimas hidrolíticas (proteinase, fosfolipase e hemolisina) por isolados clínicos de *C. albicans* em pacientes saudáveis e diabéticos. Os trinta voluntários do estudo, foram divididos em três grupos experimentais (1- voluntários diabéticos tipo I descontrolados; 2- voluntários diabéticos controlados; 3- voluntários não diabético). Cada voluntário, recebeu 10 mL de solução salina (pH 7,3) para bochecho durante 60 segundos. Os voluntários que utilizavam próteses realizaram o bochecho sem removê-las. Após o bochecho, alíquotas (50 µL) de cada voluntário foram plaqueadas em meio CHROMAgar para identificação e isolamento de *C. albicans*. Após identificação, suspensões padronizadas em RPMI (10^6 cel/mL) do fungo de cada voluntário, foram utilizadas para formação de biofilme em placas de 96 poços. Após incubação das placas a 37°C por 24 horas, os biofilmes formados foram quantificados através do ensaio com cristal violeta. Para os testes de produção enzimática, as suspensões dos isolados de cada voluntário foram padronizadas em $5x10^5$ cel/mL e plaqueadas em meios contendo substratos específicos para cada enzima. Os valores da atividade enzimática de cada enzima foram calculados pela proporção do diâmetro da colônia de *C. albicans* com o diâmetro da zona de precipitação. Os autores observaram que a formação de biofilme foi significativamente aumentada no grupo de diabéticos não

controlados quando comparado ao grupo dos diabéticos controlados ou dos voluntários saudáveis ($\rho<0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de Pz (atividade de fosfolipase), entre os grupos estudados. No entanto, a atividade da proteinase (Prz) e da hemolisina (Hz) foram significativamente maior nos grupos dos voluntários com diabetes do que no grupo dos voluntários saudáveis ($\rho<0,05$). Além disso, os autores encontraram correlação significativa entre os níveis de HbA_{1c} (hemoglobina glicosilada) dos pacientes e biomassa total ($R = 0,384$; $\rho = 0,033$), atividade da hemolisina ($R = -0,455$; $\rho = 0,010$) e atividade da proteinase ($R = -0,531$; $\rho = 0,002$). Não houve correlação aparente entre biomassa e atividade de Pz ($R = -0,305$; $\rho = 0,053$) ou atividade de Hz ($R = -0,100$; $\rho = 0,296$). No entanto, foi encontrada uma correlação negativa entre biomassa e valores de Prz ($R = -0,343$; $\rho = 0,030$). Desta forma, os autores enfatizaram que a formação do biofilme é positivamente associado à secreção de enzimas hidrolíticas.

A atividade de biofilmes tem importância em termos de patogenicidade, uma vez que é um indicador de probabilidade de crescimento, produção de enzimas degradativas e, no caso de atividade reduzida, de uma possível resistência à atividade antimicrobiana. Sabendo-se desta importância Silva et al.[80], em 2010, avaliaram a atividade metabólica de biofilmes, "*in vitro*", formados por diferentes isolados clínicos de espécies de *Candida* não *albicans*. Um total de 18 isolados clínicos de *C. parapsilosis* (n = 6), *C. tropicalis* (n = 6) e *C. glabrata* (n = 6) isolados de infecções orais, vaginais e do trato urinário foram utilizados juntamente com cepas padrão equivalentes [*C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. glabrata* (ATCC 2001)]. Os biofilmes foram formados em placas de cultura de 96 poços com suspensões padronizadas (10^7 cel/mL) e incubadas a 37°C por 48 horas. A atividade metabólica de culturas celulares (estado planctônico) e dos biofilmes foi avaliada utilizando o ensaio de XTT, que foi normalizado pelo número de colônias viáveis (UFC/mL). Análise de microscopia eletrônica de varredura também foi realizada para avaliação estrutural dos

biofilmes. Os resultados mostraram que a atividade metabólica dos biofilmes foi espécie e cepa dependente. Biofilmes de *C. glabrata* apresentaram a menor atividade metabólica, embora tenham tido o maior número de células cultivadas, em biofilmes, quando comparado com outras espécies. Semelhantemente, a atividade metabólica de células planctônicas de *C. glabrata* foi menor do que a atividade das outras espécies. Este estudo demonstra a existência de diferenças intrínsecas de atividade entre espécies de *Candida* não *albicans,* o que poderia ter implicações importantes em termos de virulência relativa de cada espécie. Além disso, a ausência de uma correlação evidente entre número de células cultiváveis (UFC/mL) e atividade metabólica dos biofilmes levanta a questão sobre qual o parâmetro mais adequado para a avaliação "*in vitro*" dos biofilmes e a significância do seu potencial clínico.

Em 2012, Jacobsen et al.[42] abordaram, através de uma revisão de literatura, as funções do dimorfismo de *C. albicans* e o potencial benefício de medicamentos que podem inibir essa transição morfológica. Para os autores, ambos estados morfológicos (blastóporos e hifas) são importantes para a virulência e apresentam funções distintas durante as diferentes fases de desenvolvimento da doença, incluindo adesão, invasão, dano, disseminação, e evasão das respostas imune do hospedeiro. Os blastóporos, devido sua forma ovóide e tamanho reduzido, são importantes para disseminação fúngica na corrente sanguínea. Por outro lado, a formação de hifas e a consequente expressão de genes associados a este estado morfológico são responsáveis por distintas funções de virulência como adesão, invasão e proteólise. Vários estudos com mutantes de *C. albicans* deficientes em genes associados às hifas, como *ALS3*, *HWP1*, *SAP 4-6,* que apresentaram virulência atenuada durante o processo infeccioso, foram relatados pelos autores. A interação entre as células hospedeiras e as duas morfologias fúngicas, também foi relatada. Macrófagos podem facilmente fagocitar blastóporos e pequenas hifas. No entanto, quando blastóporos são fagocitados, eles podem sobreviver e em determinado momento produzir hifas e perfurar a membrana, matando rapidamente os

macrófagos e permitindo o escape fúngico. A capacidade de transição de *C. albicans* entre os dois estados morfológicos é crucial para a patogênese. Desta forma, muitos pesquisadores vêem a inibição deste dimorfismo como uma opção atraente para o controle das infecções fúngicas. No entanto, para Jacobsen et al. essas opções terapêuticas podem oferecer vantagens e desvantagens. A inibição do dimorfismo pode prevenir adesão, invasão, dano a células epiteliais e endoteliais, o escape fúngico dos macrófagos para a corrente sanguínea e também pode reduzir a capacidade de aquisição de ferro pelo fungo. Além disso, tendo como alvo fatores específicos, a eficácia do medicamento é favorecida, reduzindo efeitos colaterais e a incidência de resistência microbiana. Por outro lado, esta estratégia terapêutica pode não ser completamente atraente, uma vez que as espécies não-*albicans* (incluindo espécies não produtoras de hifas) estão cada vez mais associadas a candidose disseminada. Portanto, a inibição da formação de hifas como uma estratégia antifúngica profilática ou terapêutica necessita ser bem avaliada após um diagnóstico efetivo.

A adesão dos micro-organismos aos tecidos hospedeiros é um pré-requisito para invasão e, consequentemente, infecção. Assim, de Groot et al.[25], em 2013, ressaltaram, por meio de uma revisão de literatura, a importância de adesinas no estabelecimento de doenças fúngicas. O foco principal dos autores foi as espécies de *Candida*. Segundo os autores, a parede celular de *Candida* contém várias adesinas ligadas covalentemente ao glucano, as quais governam a primeira interação entre patógeno e hospedeiro. Essas adesinas têm sido correlacionadas com diferentes partes do processo infeccioso. Dentre as adesinas de *C. albicans*, os autores destacam a família de ALS, sobretudo ALS3, e adesina HWP1, as quais exercem fundamental papel na adesão, colonização, formação de biofilme e coagregação intra e interespécies. Em função desta multiplicidade de funções, essas adesinas têm sido reconhecidas como os principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese de *C. albicans*. Esse reconhecimento foi evidenciado através de uma série de estudos envolvendo a

construção de mutantes, que demonstraram adesão e virulência reduzidas nos patógenos que apresentavam a deleção dessas adesinas. Desta forma os autores acreditam que a parede celular fúngica e seus componentes podem ser um importante alvo para a terapia antifúngica.

Com objetivo de avaliar a produção de fosfolipase (PL) e proteinase (SAP) por cepas de *Candida* não-*albicans*, Sanitá et al.[74], em 2014, avaliaram 51 isolados clínicos de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, obtidos de biofilmes formados em próteses dentárias de indivíduos saudáveis (16 isolados), indivíduos com candidose oral e diabetes (10 isolados) e indivíduos com candidose oral sem diabetes (25 isolados). Após incubação "*overnight*" dos inóculos a 37°C, as culturas celulares foram centrifugadas (5000 x g por 5 minutos), tendo os sobrenadantes e "*pellets*" sido, respectivamente, utilizados para os ensaios de atividade enzimática e quantificação do número de colônias viáveis (UFC/mL). Para os testes colorimétricos, a fosfatidilcolina foi utilizada como substrado para fosfolipase, ao passo que a azocaseína foi utilizada como substrado para a proteinase, e em seguida, a absorbância das amostras foi mensurada utilizando espectrofotômetro com densidade ótica de 630 nm e 440 nm, respectivamente. As taxas enzimáticas foram calculadas e os valores foram normalizados pelos valores de UFC/mL. De forma geral, todos os 51 isolados clínicos de *Candida* não-*albicans* avaliados foram capazes de produzir as duas enzimas degradativas sob as condições testadas. Além disso, foi possível observar que a atividade enzimática dos isolados não sofreu efeitos significativos em relação às fontes clínicas ($\rho>0,05$). Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade enzimática significativamente maiores tanto para PL e para SAP ($\rho<0,01$) quando comparada à atividade enzimática de *C. glabrata*. Os resultados encontrados apresentam alta relevância clínica, uma vez que a produção de enzimas degradativas constitui importante atributo de virulência para as espécies fúngicas. Desta forma, a caracterização do perfil enzimático é essencial para determinar estratégias para a prevenção, controle e

tratamento de infecções fúngicas e também como um possível alvo para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas.

Sanitá et al.[75], em 2014, avaliaram a secreção de enzimas hidrolíticas de isolados clínicos de *C. albicans*, uma vez que a secreção dessas enzimas é considerada um fator de virulência fundamental para o desenvolvimento de doenças. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi caracterizar a virulência de 148 isolados clínicos de *C. albicans* de usuários de próteses dentárias, avaliando a expressão de fosfolipase (PL) e proteinase (SAP). Os isolados foram obtidos de indivíduos saudáveis, indivíduos com diabetes e indivíduos sem diabetes porém com candidose oral. Para o preparo dos inóculos, os isolados foram cultivados "*overnight*" em meio YNB ("*Yeast Nitrogen Base broth*") a 37°C. Após o período de incubação, as culturas foram lavadas com PBS por meio de agitação e centrifugação e, em seguida, padronizadas espectrofotometricamente (OD 520 nm) para uma concentração final de 10^8 cel/mL. Uma alíquota de 5 µL de cada suspensão celular, previamente padronizada, foi inoculada em placas de ágar com substratos específicos para PL e SAP e incubadas a 37°C por 7 dias. A secreção enzimática foi detectada pela formação de um halo opaco ao redor das colônias e a atividade enzimática (PZ) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona do halo opaco. A origem clínica dos isolados de *C albicans* apresentou efeito significativo ($\rho<0,001$) nos valores de PZ para as duas enzimas avaliadas. Com relação à PL, os isolados clínicos dos indivíduos não diabéticos com candidose oral, e dos indivíduos diabéticos sem candidose oral apresentaram maior atividade enzimática do que os isolados provenientes de indivíduos saudáveis ($\rho<0,05$). Para SAP, os isolados de *C. albicans* provenientes dos indivíduos não diabéticos, que apresentavam candidose oral, produziram a menor atividade enzimática ($\rho<0,001$). Não houve diferenças significativas entre isolados de indivíduos saudáveis e indivíduos com diabetes ($\rho = 0,7051$).

2.2 Biofilmes bacterianos

Segundo a revisão de literatura realizada por Foster, Hook[30], em 1998, *S. aureus* contém um arsenal de proteínas secretadas e ancoradas à superfície, pelas quais ele interage com o hospedeiro. A adesão desta bactéria às células hospedeiras é mediada por adesinas de superfície denominadas pela sigla MSCRAMMs ("*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*"). O objetivo principal dos autores ao realizar a revisão foi resumir os conhecimentos da época sobre as funções e detalhes estruturais de 3 importantes MSCRAMMs [proteína de ligação à fibronectina A (fnBPA), proteína de ligação ao colágeno (cna), e proteína de ligação ao fibrinogênio, fator de aglutinação A (clfA – "*clumping fator*")]. As proteínas fnBPA e fnBPB de uma forma geral, são responsáveis por mediar a adesão bacteriana à fibronectina "*in vitro*", além de contribuirem para adesão de *S. aureus* a coágulos plasmáticos e à biomateriais "*ex vivo*" que tenham ficado em contato com hospedeiro por um longo período, portanto, são fatores importantes que contribuem para o início da infecção. A proteína cna é um importante fator de virulência em infecções ósseas e articulares pois é mediadora da adesão bacteriana à substratos colágenos e cartilaginosos. Diferente de outras MSCRAMMs, a cna geralmente não é expressa por todas as estirpes de *S. aureus*. A proteína clfA está presente em todas as fases de crescimento bacteriano e é mediadora da ligação ao coágulo sanguíneo formado "*in vitro*" e à biomateriais que ficaram em contato com sangue humano por curto período de tempo (< 6 horas). Segundo os autores, *S. aureus* é capaz de utilizar numerosos mecanismos de adesão e estratégias para combater os sistemas de defesa do hospedeiro. Além disso, os autores ressaltaram que as evidências indicando que as MSCRAMMs funcionam "*in vivo*" como adesinas e fatores de virulência, resultam de estudos que compararam mutantes isogênicos com estirpes parental em modelos de infecção. No entanto, os autores destacam que dados conclusivos sobre a totalidade de funções das

MSCRAMMs são dificultados, tendo em vista a redundância dos mecanismos de adesão de *S. aureus*.

Um dos principais fatores na patogênese de infecções estafilocócicas é a colonização e formação de biofilme em diferentes superfícies. Até o ano 2000, o teste visual com tubos de ensaio e o teste quantitativo com placa de microtitulação consistiam nas técnicas mais utilizadas para quantificar a formação desses biofilmes. No entanto, nesse mesmo ano, Stepanovic´ et al.[86] realizaram um estudo com o objetivo de testar uma modificação da técnica com placas de microtitulação para a quantificação de biofilmes. A técnica modificada envolvia etapas de fixação dos biofilmes bacterianos com metanol, seguido da coloração com violeta cristal e a fase adicional de liberação do corante com ácido acético glacial 33%, para que a medida da densidade óptica (OD) da solução fosse detectada a 570 nm através de um leitor imunoenzimático. Para esse estudo, 30 cepas estafilocócicas foram utilizadas (4 cepas padrão - *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 8325, *S. epidermidis* ATCC 14990 e *Staphylococcus sciuri* ATCC 29062 e 12 isolados clínicos de *S. aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus gallinarum*). Após 24 horas de incubação a 37°C, os biofilmes formados foram quantificados através das três técnicas [técnica do tubo de ensaio, teste da placa de microtitulação padrão e teste da placa de microtitulação modificada (com etapa adicional de ácido acético 33%)]. A técnica modificada, sendo um ensaio quantitativo, foi superior em termos de objetividade e acuidade à técnica visual utilizando os tubos de ensaio. Além disso, a técnica modificada também foi superior à técnica de placas padrão, uma vez que permitiu a quantificação das bactérias aderidas não apenas no fundo como também nas paredes laterais dos poços, enquanto a técnica padrão quantificou espectrofotometricamente apenas o corante ligado às bactérias aderidas ao fundo dos poços. Diferenças altamente significativas entre os valores de OD obtidos pela técnica padrão e aqueles obtidos pela técnica modificada

possibilitaram os autores sugerirem que um grande número de bactérias aderem às paredes dos poços. Desta forma, a modificação da técnica padrão, pela introdução de uma etapa adicional de descoloração por ácido acético, constitui uma melhoria útil para as técnicas de quantificação de biofilmes estafilocócicos formados em placas de poliestireno.

Smith et al.[82], em 2001, realizaram um estudo de revisão sobre a colonização e infecção estafilocócica da cavidade oral e sua influência na saúde sistêmica. Nessa revisão, os autores citam artigos em que não há tendências claras relacionadas com idade e presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade oral, uma vez que espécies desse micro-organismo foram isoladas da microbiota bucal de crianças (1 – 5 anos) e adultos (27 – 84 anos). Foi observado, também, que dispositivos protéticos na cavidade oral podem atuar como reservatórios microbianos, podendo contribuir para a infecção de outros locais do corpo ou para a infecção cruzada entre pacientes e profissionais da saúde. Os autores relataram, ainda, que a prevenção da transmissão de MRSA tem se tornado cada vez mais importante devido ao aumento da prevalência deste patógeno. Frequentemente são realizadas tentativas para erradicar a transmissão de MRSA de indivíduos colonizados, mas experiências clínicas demonstraram que essa erradicação pode ser difícil. A mupirocina raramente é efetiva na remoção da colonização orofaríngea por MRSA. A erradicação é alcançada com o uso de rifampicina e ácido fusídico associados ao uso tópico da mupirocina. Com base nos dados levantados, foi concluído que o papel dos *Staphylococcus* spp. na microbiota bucal ainda é pouco conhecido, havendo um crescente interesse pelos pesquisadores no estudo de micro-organismos oportunistas da cavidade oral que crescem em biofilme e tendem a ser menos suscetíveis a uma variedade de agentes antimicrobianos, como é o caso do MRSA. Os autores sugeriram que trabalhos futuros podem oferecer avanços e novas informações sobre a origem da infecção estafilocócica e conceitos de profilaxia antibiótica em pacientes de risco submetidos

a tratamento odontológico, resultando, assim, em maior sucesso na erradicação da disseminação de cepas de MRSA.

O entendimento de mecanismos responsáveis pela adesão dos micro-organismos às células epiteliais humanas pode conduzir a métodos alternativos de descolonização que não dependem da suscetibilidade antimicrobiana. Desta forma, O'Brien et al.[55], em 2002, demonstraram pela primeira vez que a proteína clfB expressa na superfície de cepas de *S. aureus*, promoveu a adesão desta bactéria à citoqueratina de células epiteliais nasais. Para esse estudo, placas de 96 poços foram recobertas com queratina, e incubadas *"overnight"* a 4°C para receber suspensões padronizadas de *S. aureus* (cepas parental e mutante com deficiência de *clfB*). As células aderidas foram quantificadas através do cristal violeta e microscopia confocal foi utilizada para analisar a adesão da bactéria à queratina. O efeito da utilização de anticorpos anti-*clfB* também foi investigado. Além disso, foi avaliada a adesão à citoqueratina de uma cepa de *Lactococcus lactis* expressando heterologamente o gene *clfB.* A adesão da cepa parental de *S. aureus* foi inibida pelos anticorpos anti-*clfB* e a cepa de *S. aureus* mutante com deficiência de *clfB* aderiu fracamente à citoqueratina quando comparada a cepa parental. Além disso, a expressão de *clfB* promoveu a adesão do *L. lactis* às células epiteliais humanas. Através da citometria de fluxo, foi possível observar que a citoqueratina 10 (K10) foi exposta na superfície das células epiteliais nasais e na superfície dos queratinócitos. Ensaio de imunofluorescência revelou que o gene *clfB* ligou-se diretamente a K10 extraída de células epiteliais nasais. Desta forma, os autores propuseram que o *clfB* é um fator determinante na colonização nasal de *S. aureus*, e que com base nesses resultados, percepções importantes são fornecidos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos capazes de erradicar a colonização nasal por *S. aureus*.

Em 2005, Candi et al.[14] abordaram através de uma revisão de literatura os mecanismos envolvidos na diferenciação e queratinização epitelial. Essa diferenciação

epitelial é conhecida como a única forma de morte celular programada. Para os autores, a proliferação celular, seguida da diferenciação e morte, ocorrem de forma sequencial e cada um desses processos são caracterizados pela expressão de proteínas específicas. Citoqueratinas K1 e K10 estão entre as principais proteínas a serem expressas durante a queratinização. A função de outras proteínas em diferentes fases desse processo de rejuvenescimento epitelial também foi avaliada pelos autores. Uma expressão normal do conjunto dessas proteínas proporciona o bom funcionamento do tecido epitelial como barreira física, excluindo substâncias e organismos estranhos e como barreira de permeabilidade, evitando a perda de fluidos vitais, funções essenciais para a sobrevivência. No entanto, anormalidades desse processo altamente organizado, podem resultar em doenças epiteliais específicas. Dessa forma, os autores concluíram que essa revisão contribuiu com novas percepções sobre os mecanismos moleculares e os resultados fisiológicos de queratinização, aumentando a compreensão sobre manifestações patológicas que podem ocorrer quando há a quebra da homeostase desse processo de morte celular programado.

Para Gordon, Lowy[33], em 2008, aproximadamente 20% dos indivíduos apresentam colonização nasal persistente por *S. aureus*, enquanto 30% são colonizados de forma intermitente. Para os autores, a colonização acaba sendo um reservatório bacteriano, e quando as defesas do hospedeiro são violadas, essa colonização se torna um risco para subsequente infecção. De fato, alguns estudos demonstraram que em uma bacteremia, isolados do sangue foram idênticos aos isolados nasais em 82% dos voluntários. Diante desses fatos, os autores objetivaram revisar os aspectos gerais da patogênese estafilocócica, com ênfase em cepas resistentes à meticilina (MRSA) adquiridas tanto no ambiente hospitalar (HA-MRSA) como também na comunidade (CA-MRSA). A resistência de cepas de *S. aureus* é conferida pela presença do gene *mecA* que codifica uma proteína nomeada PBP2A (“*penicillin-binding protein*”) que diminui a afinidade por β-lactâmicos. Esse gene faz parte

de um elemento móvel chamado SCC mec ("*staphylococcal cassette chromosome*"), o qual pode ser transferido horizontalmente intra e interespécies. Segundo os autores, provavelmente uma cepa sensível recebeu esse SCC mec e passou a ser resistente. Para os autores, a colonização estafilocócica é possível devido à capacidade desta bactéria aderir às células hospedeiras e evadir as respostas imunes. A adesão, de *S. aureus* tanto às células hospedeiras quanto à superfícies abióticas é mediada por MSCRAMMs. Após adesão, *S. aureus* é capaz de persistir na forma de biofilmes. Além disso, segundo os autores, durante a infecção *S. aureus* é capaz de produzir numerosas enzimas, como fosfolipase, protease e elastase, que destroem os tecidos hospedeiros, permitindo a metástase bacteriana para outros locais. Os autores também ressaltam a capacidade de *S. aureus* formar pequenas colônias variantes (SCVs) que são capazes de "esconderem" nas células hospedeiras, sem causar qualquer tipo de dano, estando protegidas da ação dos antimicrobianos e das defesas do hospedeiro. No entanto, essas colônias podem, em algum momento, reverter a um fenótipo mais virulento, contribuindo desta forma, para uma infecção recorrente. Um fator importante, sobre esta bactéria, destacado pelos autores é que cepas de MRSA não são necessariamente mais virulentas que cepas de MSSA. Além disso, os autores chamam a atenção para duas características notáveis desta bactéria, no qual um fator de virulência de *S. aureus* pode ter várias funções na patogênese e vários fatores de virulência podem executar a mesma função.

No estudo realizado por Peeters et al.[60], em 2008, vários métodos para a quantificação microbiana foram comparados. Para a quantificação do biofilme formado em placas de microtitulação de 96 orifícios foram utilizados os ensaios de cristal violeta (CV), ensaio de Syto-9, ensaio de diacetato de fluoresceína (FDA), ensaio de resazurina, ensaio de XTT e o ensaio de azul de metileno (DMMB). Para a formação dos biofilmes analisados foram utilizados os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *S. aureus*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*. Em geral, estes ensaios mostraram uma

aplicabilidade ampla e uma elevada reprodutibilidade para a maioria dos isolados. Além disso, a estimativa do número de UFC/mL dos biofilmes mostraram baixas variações entre os diferentes ensaios. Adicionalmente, a maioria dos ensaios foram considerados simples, rápidos e perfeitamente adequados para a quantificação dos biofilmes. No entanto, o teste de XTT foi considerado caro, e de acordo com os autores não mostrou valores que acrescentassem na quantificação celular quando comparado aos ensaios de resazurina e FDA. O teste de CV apesar de ser considerado barato, simples e comumente utilizado na quantificação de diversos biofilmes não se mostrou reprodutível para as cepas de *P. aeruginosa* testadas, além de não permitir diferenciar células vivas e mortas. Para esta aplicação específica, os testes de FDA, resazurina e Syto-9 foram considerados mais apropriados.

Wertheim et al.[95], em 2008, avaliaram o papel da proteína de superfície estafilocócica, chamada "*clumping factor B*" (clfB), na colonização nasal humana por *S. aureus*. Para isto, o estudo contou com 16 voluntários (6 do gênero masculino e 10 do gênero feminino) saudáveis com idade média de 32 anos. Para infecção nasal dos voluntários, suspensões padronizadas de duas cepas de *S. aureus* foram utilizadas (uma cepa parental e uma cepa mutante deficiente de clfB). Uma das narinas dos voluntários foi inoculada com a mistura (1:1) das duas cepas ($2x10^7$ UFC/mL) e a narina contra lateral foi inoculada com a cepa ($1x10^7$ UFC/mL) mutante ou com a cepa parental. A sobrevivência das duas cepas foi acompanhada nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 e 28 após inoculação, através do teste de contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL). O tempo médio de sobrevivência da cepa parental foi significativamente maior do que o tempo da cepa mutante. A maior parte dos voluntários (14 dos 16) não abrigaram a cepa mutante após o 4° dia de infecção, diferentemente do que ocorreu com os voluntários que foram inoculados, em uma das narinas, com a cepa parental. Após duas semanas, todos os voluntários tinham eliminado a cepa mutante, no entanto três

voluntários permaneceram com a cepa parental mesmo após os 28 dias de acompanhamento. Outro resultado interessante, foi que a cepa parental (contida na mistura) de uma das narinas foi encontrada na narina contra lateral que havia sido infectada apenas com a cepa mutante, no entanto, o contrário não ocorreu. Com base nos resultados, os autores concluíram que a adesina estafilocócica clfB, é um atributo de relevância na colonização nasal humana, e portanto, um alvo potencial para estratégias de descolonização estafilocócica.

Tem sido estimado que 65% das infecções nos seres humanos está relacionada à presença de biofilmes. Isso ressalta a importância de se avaliar a atividade de antibióticos sobre este modo de crescimento e não apenas sobre células planctônicas. Desta forma, Smith et al.[85], em 2009, avaliaram a eficácia de antibióticos convencionalmente utilizados (clindamicina, linezolida e vancomicina), e daqueles recentemente disponíveis (daptomicina e tigeciclina) contra isolados clínicos de MRSA crescidos em biofilmes. Doze isolados clínicos de MRSA foram selecionados, com base na capacidade de formarem biofilmes maduros em um período de 48 horas. A mínima concentração inibitória (MIC) e a mínima concentração bactericida (MBC) dos 5 antibióticos foi determinada para cada um dos 12 isolados em culturas planctônicas. Dois dos doze isolados de MRSA foram selecionados para o ensaio de "tempo de morte" para cada antibiótico (nas concentrações de 0,5×, 1× e 4× MIC). Esse teste foi quantificado através do número de colônias viáveis (UFC/mL) em placas de Mueller–Hinton. Além disso, biofilmes maduros dos 12 isolados foram formados, em placas de 96 poços, após 48 horas de incubação a 37°C. Após o período de incubação, os biofilmes maduros foram expostos a cada antibiótico durante 24 horas e o número de células viáveis foi quantificado pelo ensaio de XTT. As taxas de MIC para daptomicina, linezolida, tigeciclina, clindamicina e vancomicina foram 0,06-0,25; 1-2; 0,06; 0,125-1,024 e 0,5-1 μg/mL, respectivamente. Após 6 horas de incubação das células planctônicas com os antibióticos, foi possível observar que daptomicina e vancomicina apresentaram um efeito bactericida

enquanto clindamicina, linezolida e tigeciclina apresentaram efeito bacteriostático. Nenhum dos antibióticos foi capaz de exterminar 100% os isolados quando estavam associados em biofilmes. A sobrevivência das células em biofilmes tratados com clindamicina, daptomicina, linezolida, tigeciclina e vancomicina foi em média 62%, 4%, 45%, 43% e 19%, respectivamente. Com base nos resultados, os autores concluíram que apesar de todos os antibióticos testados terem sido eficazes contra populações estafilocócicas na forma planctônica, apenas a vancomicina e daptomicina apresentaram efetividade superior contra os isolados associados em biofilmes.

O biofilme de MRSA em próteses pode ser facilmente aspirado pelos usuários, causando infecções como a pneumonia aspirativa. Assim, Altieri et al.[7], em 2012, realizaram um estudo para avaliar a eficácia de duas soluções desinfetantes e irradiação por micro-ondas na desinfecção de próteses totais contaminadas com MRSA. Os autores contaminaram 36 próteses totais com MRSA e as dividiram em quatro grupos iguais: 1) grupo controle positivo composto por próteses que não foram desinfetadas; 2) grupo imerso em hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos; 3) grupo imerso em digluconato de clorexidina 2% durante 10 minutos; 4) grupo submetidos a irradiação de micro-ondas a cerca de 650 W durante 3 minutos. Foi realizada a contagem de colônias e também foi avaliada a eficácia dos tratamentos após 7 dias de desinfecção. Todas as próteses do grupo controle mostraram crescimento microbiano substancial sobre as placas (6,24 $\log_{10}$ UFC/mL). Após 7 dias de incubação, os autores observaram crescimento nas próteses descontaminadas com hipoclorito de sódio 1%. A imersão em solução de digluconato de clorexidina e irradiação de micro-ondas resultou em desinfecção completa de todas as próteses contaminadas com MRSA, tanto a curto e a longo prazo. Os autores concluíram que a irradiação por micro-ondas e digluconato de clorexidina 2% podem ter uma aplicação desinfetante em consultórios odontológicos e instituições em

que usuários de prótese total são tratados, melhorando assim a longevidade e qualidade de vida dos pacientes.

S. aureus pode expressar uma vasta gama de fatores de virulência, incluindo as proteínas de superfície que estão covalentemente ligadas ao peptidoglicano e são conhecidas como proteínas ancoradas à parede (CWA – "*cell wall-anchored proteins*"). Como essas proteínas de superfície são cruciais para o sucesso de *S. aureus,* tanto como comensal ou como agente patogênico, Foster et al.[31], em 2014, propuseram, por meio de uma revisão de literatura, analisar as funções de algumas dessas proteínas, bem como a estrutura de cada uma delas, permitindo a sua classificação em diferentes grupos. Os autores deram um enfoque maior nas proteínas de superfície do grupo MSCRAMMs ("*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*"), que são a maior classe de proteínas ancoradas a parede celular de *S. aureus*. De acordo com os autores, este grupo de proteínas apresenta inúmeras funções, incluindo adesão, invasão de células e tecidos hospedeiros, formação de biofilme e evasão da resposta imune. Como exemplos de MSCRAMMs e importantes atributos de virulência, é possível destacar proteínas como clfA, clfB, fnBPA, fnBPB, cna e sdrC. Os autores ainda chamam a atenção para a redundância de função dessas proteínas, ou seja, mais de uma proteína pode exercer a mesma função, e apenas uma proteína pode ter mais de uma função. Além disso, a função dessas proteínas pode variar entre diferentes espécies hospedeiras, portanto, estudos com modelos de infecção animal devem ser cuidadosamente interpretados ao serem extrapolados para situação humana. Para os autores não restam dúvidas que essas proteínas de superfície são cruciais para a interação de *S. aureus* com o hospedeiro, além de serem indispensáveis para a sobrevivência dessa bactéria, seja em estado comensal ou durante estado patogênico. Dessa forma, essas proteínas podem constituir potenciais antígenos e uma opção terapêutica atraente no combate de infecções estafilocócicas.

2.3 Interação fúngica-bacteriana

Em 1982, Carlson[15] investigou "*in vivo*", em um modelo de camundongos a possibilidade de uma interação sinérgica entre *C. albicans* e *S. aureus*. Para esse estudo, suspensões padronizadas dos dois micro-organismos foram utilizadas para infectar os camundongos por meio de injeções intraperitoneais. Para as injeções com culturas simples, 0,2 mL de solução salina foi utilizada em substituição à outra espécie. Os animais infectados foram observados a cada 12 horas durante uma semana. Os animais que apresentaram morte antecipada foram imediatamente autopsiados e tiveram os órgãos da cavidade abdominal retirados para quantificar o número de colônias viáveis em meios de cultura seletivos para cada espécie. Os animais que tiveram as duas espécies coinoculadas intraperitonealmente apresentaram infecção abdominal generalizada, com todos os órgãos abdominais infectados pelos dois micro-organismos, com predominância das bactérias. Os camundongos apresentaram elevada resistência quando inoculados com apenas um patógeno. No entanto, os animais que receberam injeções com ambas as espécies, mesmo em doses que não foram letais quando utilizadas para injeções com culturas simples, apresentaram 100% de mortalidade. Dessa forma, o autor concluiu que *C. albicans* e *S. aureus* interagem sinergicamente, resultando em um aumento da mortalidade dos camundongos.

O efeito da proteinase extracelular de *C. albicans* nas atividades bactericida e opsonizante no soro humano foi estudado por Kaminishi et al.[43] em 1995. Para isso, cepas de *C. albicans* IFO1385 foram mantidas em meio rico em nitrogênio para induzir a produção de proteinase. Amostras de sangue, obtidas de voluntários saudáveis, foram centrifugadas para a separação do soro. Além disso, leucócitos polimorfonucleares (PMNs) foram purificados. Suspensões *"overnight"* de *S. aureus* 209P foram administradas em soro humano normal ou pré tratado com proteinase e incubados por 30 minutos a 37°C. Após incubação, os PMNs purificados ($5x10^5$) foram adicionados no soro e amostras da mistura foram coletadas nos

tempos 0, 15, 30 e 60 minutos para quantificação do número de *S. aureus* viáveis (UFC/mL). Quando *S. aureus* foi opsonizado com soro humano normal e incubado com os PMNs, mais de 99% das bactérias foram rapidamente fagocitadas e mortas pelos PMNs. Por outro lado, quando *S. aureus* foi opsonizado com soro humano pré tratado com proteinase de *C. albicans*, pelo menos 25% das bactérias permaneceram vivas, mesmo após 60 minutos de incubação. A redução na atividade opsonizante de soro humano foi atribuída à degradação da porção Fc da imunoglobulina G pela ação da proteinase de *C. albicans*, tal como determinado pela reação de imunoprecipitação. A redução da atividade bactericida do soro foi atribuída à degradação da molécula C3 do sistema complemento pela proteinase, no entanto, a molécula C5 resistiu à ação da proteinase. Adicionalmente, a proteinase também foi capaz de degradar inibidores endógenos de proteinase, os quais estão envolvidos na regulação da inflamação. Desta forma, os autores concluíram que a quebra dos mecanismos de defesa humoral do hospedeiro pela ação da proteinase de *C. albicans* pode deixar os hospedeiros mais vulneráveis a infecções microbianas, além de agravar doenças em hospedeiros imunocomprometidos.

O reconhecimento da heterogeneidade de micro-organismos associados em biofilme pode influenciar as decisões de tratamento, especialmente em pacientes que não respondem à terapia inicial. Devido esta importância, El-Azizi et al.[29], em 2004, estudaram as interações entre *C. albicans* e outras 12 espécies de *Candida* (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis* e *C. guillieromondii*) e bactérias [*P. aeruginosa* (produtora e não produtora de glicocálix), *S. epidermidis* (produtora e não produtora de glicocálix), *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*] dentro de biofilmes. Três diferentes estratégias foram selecionadas para este estudo, 1) adição de *C. albicans* à biofilmes pré formados de outras espécies de *Candida*; 2) adição simultânea de dois micro-organismos e 3) adição de espécies de *Candida* em biofilmes pré formados de *C. albicans*. Os biofilmes foram formados em tubos de poliestireno contendo 2 mL de RPMI e suspensões

padronizadas de cada isolado. Após 48 horas de formação dos biofilmes o número de células foi quantificado através da contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL) em placas de ágar específico. Microscopia eletrônica também foi utilizada para análise estrutural dos biofilmes. O número de UFC/mL de *C. albicans* foi reduzido significativamente ($\rho<0,05$) quando o fungo foi adicionado à biofilmes pré formados de outras espécies de *Candida* e bactérias, com exceção para *C. parapsilosis, C. glabrata* e para *P. aeruginosa* produtora de glicocálix. Quando *C. parapsilosis, S. epidermidis* (não produtor de glicocálix) ou *S. marcescens* foram adicionados à biofilmes pré formados de *C. albicans*, o número de células desses micro-organismos aumentou significativamente. Com base nos resultados, os autores concluíram que a coexitência entre *C. albicans* e outras espécies de *Candida* é possível quando *C. albicans* domina o biofilme. Além disso, o número de células dentro do biofilme, está diretamente correlacionado com a capacidade de adesão de cada isolado. Inibição da adesão e consequente formação de biofilme foi vista quando havia a presença de dois isolados altamente aderentes que competiam por lugares disponíveis, ao passo que o aumento da adesão entre os isolados foi visto quando um isolado era altamente aderente e outro menos aderente.

O objetivo do estudo de Baena-Monroy et al.[10], em 2005, foi determinar a prevalência de *C. albicans*, *S. aureus* e *Streptococcus mutans* na mucosa oral e nas próteses de pacientes com e sem estomatite protética, além de correlacionar a presença desses patógenos com outros potenciais fatores clínicos. Para isto, cento e cinco pacientes usuários de próteses orais (43 do gênero masculino e 62 do gênero feminino, com idade média de 67 anos) foram selecionados. Inicialmente, a saliva desses pacientes foi coletada para verificação do pH. Amostras da microbiota da mucosa oral e da superfície interna das próteses maxilares foram coletadas utilizando algodão estéril. Em seguida, a identificação e isolamento dos micro-organismos de interesse foram feitos através de métodos convencionais de

microbiologia. A fim de complementar o método de identificação através de meios específicos, observações em microscópio também foram procedidas. Diabetes e hipertensão foram as doenças sistêmicas mais frequentes entre os pacientes avaliados. A alta ingestão de hidratos de carbono foi observada em inúmeros pacientes. Além disso, a estomatite protética foi relatada em 50 pacientes, cuja média do pH salivar foi de 5,2. A presença de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* na membrana mucosa e na superfície interna das próteses foi de 51,4%, 52,4% e 67,6%, respectivamente. *C. albicans* foi isolada em 66,7%, das próteses, enquanto *S. aureus* e *S. mutans* foram isolados em 49,5% das mesmas próteses. A presença de *C. albicans* na mucosa oral dos pacientes com estomatite protética foi de 86% e a presença de *S. aureus* apresentou percentagem semelhante (84% dos pacientes). O isolamento de *S. mutans* foi menos frequente, e foi observado em 16% das amostras orais destes pacientes. A associação entre *C. albicans* e *S. aureus* foi observada na mucosa oral de 45 pacientes e em 19 próteses. Com base nos resultados do estudo, os autores enfatizaram que *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* colonizam frequentemente a mucosa oral de pacientes usuários de próteses orais. Além disso, a presença desses patógenos é mais frequente em pacientes que apresentam o quadro de estomatite protética.

A avaliação do efeito qualitativo e quantitativo de diferentes concentrações de bactérias orais na formação de biofilmes de *C. albicans*, em superfícies de poliestireno, foi avaliada por Thein et al.[92], em 2006. Quatro bactérias encontradas na placa dental [*Actinomyces israelii* (ATCC 10048), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224), *S. mutans* (TCC 35668), *Streptococcus intermedius* (ATCC 27335)], dois periodontopatógenos [*Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)] e dois colonizadores orais transitórios [*P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922)] foram utilizados para esta finalidade. Suspensões padronizadas de *C. albicans* (10^7 cel/mL) foram utilizadas para formação dos biofilmes em placas de poliestireno de 96 poços

por 3,5 horas (1,5 hora fase de adesão + 2 horas de desenvolvimento do biofilme) a 37°C. Em seguida concentrações ($1x10^7$, $5x10^6$, $2,5x10^6$, $1,25x10^6$, $6,25x10^5$) das espécies bacterianas foram adicionadas no biofilme fúngico e incubados por 48 horas. A formação do biofilme foi quantificada pelo número de células viáveis (teste de UFC/mL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Coculturas com diferentes concentrações de bactérias apresentaram efeitos variáveis na formação do biofilme fúngico. Com exceção das coculturas com *L. acidophilus*, *S. mutans* e *S. intermedius*, uma diminuição consistente no número de *C. albicans* ($\rho<0,05$) foi observada quando cocultivadas com concentrações mais elevadas das bactérias. A cocultura com *P. aeruginosa* provocou uma inibição significativa do biofilme de *C. albicans* em todas as concentrações testadas. *S. mutans* e *S. intermedius* não apresentaram efeito significativo na viabilidade do biofilme fúngico. Imagens de MEV revelaram um densa rede de hifas após 48 horas, com uma massa considerável de matriz ligando blastóporos, filamentos e bactérias. Com base nos resultados, os autores concluíram que a natureza qualitativa e quantitativa de bactérias é capaz de modular a formação do biofilme por *C. albicans* em ambientes de espécies mistas, tais como a cavidade oral.

Sabendo-se que *C. albicans* coloniza a cavidade oral em conjunto com múltiplas espécies bacterianas, Bamford et al.[11], em 2009, avaliaram a interação de *C. albicans* e *Streptococcus gordonii*. Suspensões padronizadas de *C. albicans* SC 5314 e *S. gordonii* DL1 (cepa parental e cepa mutante em *sspA sspB*) foram utilizadas. Biofilmes simples e mistos dos dois micro-organismos foram formados sobre placas de 96 poços, para os testes de formação de hifas e biofilmes, e sobre lamínulas para análise estrutural do biofilme através de microscopia. Biofilmes simples de *C. albicans* em estágios iniciais de desenvolvimento apresentaram aproximadamente 30% de hifas. Em biofilmes mistos com cepa parental de *S. gordonii*, o desenvolvimento das hifas foi aumentado, apresentando aproximadamente 60% deste estado morfológico. Outro resultado interessante, foi que a biomassa dos biofilmes

mistos foi pelo menos duas vezes maior que a biomassa dos biofilmes simples. Além disso, o contato célula-a-célula entre estes micro-organismos envolve a proteína da parede celular (sspA e sspB) de *S. gordonii*, uma vez que, a cepa mutante com ausência desta proteína apresentou fraca interação com o fungo. A repressão da formação do biofilme e da formação de hifas pela molécula de quorum-sensing farnesol foi aliviada na presença da bactéria. Desta forma, estes resultados sugerem que as interações entre *C. albicans* e *S. gordonii* envolvem sinais físicos e químicos que influenciam o desenvolvimento dos biofilmes. Assim, as bactérias podem desempenhar um papel significativo na modulação de processos de transporte e infecção de *Candida* na cavidade oral.

Uma vez que *C. albicans* forma biofilmes monomicrobianos no soro, um meio clinicamente relevante, Harriott, Noverr[35], em 2009, investigaram a capacidade de *S. aureus* formar biofilme neste meio, tanto em biofilmes mono e polimicrobianos com *C. albicans*. Além disso, os autores testaram a sensibilidade antimicrobiana desses biofilmes. Para isto, suspensões padronizadas em 10^6 células/mL de *C. albicans* (SC 5314) e 10^6 a 10^8 células/mL de *S. aureus* (ATCC 25923), foram adicionadas em volumes de 100 µL e 10 µL respectivamente, em placas de poliestireno de 96 poços para a formação dos biofilmes polimicrobianos. Poços com culturas simples de *C. albicans*, e culturas simples de *S. aureus* nas mesmas concentrações foram utilizados como controles. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para formação dos biofilmes. Após o período de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS estéril para remoção das células não aderidas. Em seguida, os biofilmes foram monitorados pelo teste de UFC/mL em placas de SDA suplementadas com ampicilina (0,008 mg/mL) e eritromicina (0,075 mg/mL) e placas de BHI suplementadas com anfotericina B (0,025 mg/mL). Microscopia de fluorescência também foi utilizada para avaliação estrutural dos biofilmes. Para os testes de suscetibilidade antimicrobiana, os biofilmes formados foram incubados por mais 24 horas a 37°C com 100 µL de soluções

estoque de anfotericina B e vancomicina e em seguida submetidos ao teste de UFC/mL. Apesar de culturas simples de *S. aureus* não serem capazes de formar biofilmes no soro, quando cultivada na presença de *C. albicans*, um biofilme polimicrobiano foi formado. No teste de UFC/mL o número de *C. albicans* não apresentou diferenças significativas entre biofilmes mono e polimicrobiano. No entanto, o número de *S. aureus* foi significativamente maior nos biofilmes polimicrobianos. Em termos de estrutura, foi possível observar que *C. albicans* forma a base do biofilme, com um denso tapete de hifas e blastóporos, e *S. aureus* além de apresentar colônias na superfície do biofilme, apresentou também uma associação preferencial às hifas. Nos biofilmes polimicrobianos, *S. aureus* foi envolvido por um halo distinto, sugerindo que a bactéria pode ser coberta pela matriz secretada por *C. albicans*, o que conferiu ao *S. aureus* resistência reforçada à vancomicina. No entanto, a sensibilidade de *C. albicans* à anfotericina B não foi alterada em biofilmes polimicrobianos.

Para Shirtliff et al.[78], em 2009, a presença de infecções polimicrobianas tem implicações importantes, uma vez que esta infecção modifica o curso clínico da doença, impactando a seleção de terapia antimicrobiana e a resposta prevista para o tratamento, especialmente quando se trata de agentes patogênicos que já exibem alguma resistência antimicrobiana. Desta forma, para os autores, caracterizar a natureza da complexa interação entre espécies microbianas é o primeiro passo para entender a natureza de sua convivência no hospedeiro. Devido a isto, esses autores objetivaram revisar estudos que avaliaram as interações mutualísticas, sinérgicas, parasitárias e antagônicas que podem ocorrem entre a variada gama de espécies que co-habitam os diferentes ambientes do corpo humano. Sobretudo, os autores deram enfoque às coagregações intergenéricas que ocorrem entre *C. albicans* e espécies bacterianas orais, as quais possivelmente desempenham um fator importante na colonização dessas espécies nas diferentes superfícies da cavidade oral. Devido ao crescente desenvolvimento de resistência à antimicrobianos e envolvimento em infecções

crônicas e sistêmicas, biofilmes polimicrobianos formados por *C. albicans* e *S. aureus* receberam maior destaque pelos autores. A interação entre esses dois patógenos resulta em um processo dinâmico e interativo, com expressão diferencial de genes e proteínas. Para os autores, os estudos encontrados na literatura suportam a idéia de que esses micro-organismos possuem diversos mecanismos de sinalização para detectar e responder uns aos outros através de moléculas sinalizadoras de "quorum-sensing" (QS). Desta forma, os autores concluíram que o entendimento dos mecanismos de adesão e de sinalização envolvidos nessas interações fúngicas-bacterianas pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para impedir a colonização microbiana e desenvolvimento de doenças polimicrobianas.

Sabendo-se que a doença periodontal pode constituir um risco para o desenvolvimento de doenças sistêmicas, Cuesta et al.[24], em 2010, avaliaram a prevalência de espécies de *Staphylococcus*, sobretudo *S. aureus* em biofilmes formados na placa subgengival e na cavidade oral de indivíduos com doença gengival e/ou periodontal. Além disso, os autores objetivaram associar a presença dessas bactérias com espécies de *Candida* e a correlação entre o uso de aparelhos orais e o aumento desses patógenos. O estudo foi realizado com 82 pacientes (54,9% mulheres e 45,1% homens) com idade variando entre 18 e 70 anos, que apresentavam doença periodontal e pelo menos dois locais com profundidade de sondagem maior ou igual a 3 mm. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o estágio da doença gengival. Dessa forma, 26 pacientes apresentavam gengivite e 56 periodontite. Amostras de biofilme subgengival foram obtidas utilizando curetas Gracey 7/8, após a remoção do biofilme supragengival, e amostras da cavidade oral (mucosa bucal, língua e mucosa jugal) foram obtidas por "*swabs*" estéreis. De todos os pacientes avaliados, em amostras provenientes de bolsas periodontais, 42,7% apresentaram espécies de *Staphylococcus* enquanto 25,6% exibiram espécies de *Candida*. A porcentagem de espécies de *Staphylococcus* e *Candida* na cavidade oral foi de 69,5% e 42,7%, respectivamente. 13,4%

dos pacientes tinham ambos os micro-organismos em bolsas periodontais enquanto que a porcentagem da presença combinada dos patógenos na cavidade oral foi de 36,6%. A prevalência de *S. aureus* foi de 13,4% na bolsa periodontal e 15,8% na cavidade oral. *C. albicans* foi a levedura mais prevalente em bolsas periodontais (76,2%) e na cavidade oral (63,0%). Além disso, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi encontrado tanto em bolsas periodontais, como na cavidade oral em 7,3% (n=6) dos pacientes avaliados. Um aumento da prevalência de *C. albicans* e *S. aureus* foi observado em amostras de pacientes que faziam uso de aparelhos orais.

Como em biofilmes polimicrobianos *S. aureus* associa-se preferencialmente às hifas de *C. albicans*, Harriott, Noverr[36], em 2010, utilizaram cepas de *C. albicans* mutantes, deficientes em reguladores da transcrição morfogênica (*cph1* e *efg1*) e da formação de biofilme (*bcr1*) para investigar o papel das hifas em mediar a formação de biofilmes polimicrobianos. Para isto, suspensões padronizadas em 10^6 células/mL de *C. albicans* mutante - DAY 185 (gerada a partir da estirpe SC 5314) e 10^6 a 10^8 células/mL de *S. aureus* (ATCC 25923), foram adicionadas em volumes de 100 µL e 10 µL respectivamente, em placas de poliestireno de 96 poços para a formação dos biofilmes polimicrobianos. Poços com culturas simples de *C. albicans* e culturas simples de *S. aureus* nas mesmas concentrações foram utilizados como controles. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para formação dos biofilmes. Após o período de incubação, os poços foram lavados com PBS estéril para remoção das células não aderidas. Em seguida, os poços foram ressuspendidos em 100 µL de PBS e sonicados por 10 minutos. Diluições (10 x) de cada poço foram realizadas e os biofilmes foram monitorados pelo teste de UFC/mL em placas de SDA suplementadas com ampicilina (8 mg/mL) e eritromicina (75 mg/mL) e placas de BHI suplementadas com anfotericina B (0,025 mg/mL). Microscopia de fluorescência também foi utilizado para avaliação estrutural dos biofilmes. Para os testes de suscetibilidade antimicrobiana, os

biofilmes formados foram incubados por mais 24 horas a 37°C com 100 µL de soluções estoque de anfotericina B e vancomicina e em seguida submetidos ao teste de UFC/mL. Ainda, afim de investigar se a formação de biofilme polimicrobiano por *S. aureus* no soro era dependente de *C. albicans* viáveis, três métodos (anfotericina B, formalina e tratamento com calor) foram utilizados para inibir o biofilme fúngico previamente à cocultura com a bactéria. Mais uma vez os biofilmes foram submetidos ao teste de UFC/mL. Pela análise microscópica foi possível observar que a cepa mutante *cph1* apresentou formação normal de hifas e matriz, semelhante à cepa selvagem. O mutante *efg1* apresentou a formação de hifas curtas e ausência de matriz. Já a cepa duplo mutante *efg1/cph1* não apresentou nem a formação de hifas nem de matriz. Por último, a cepa *bcr1* apresentou a formação de hifas, porém, uma grande quantidade de blastóporos e ausência de matriz, além disso, esta cepa aderiu fracamente ao poliestireno. O crescimento de *S. aureus* foi aumentado na presença da cepa de *C. albicans* que apresentou produção normal de hifas (*cph1*). No entanto, na presença da cepa mutante em *efg1* (hifas curtas) e duplo mutante efg1/cph1 (não produziram hifas) a capacidade de *S. aureus* em formar biofilme polimicrobiano foi reduzida ou anulada respectivamente. A resistência de *S. aureus* à vancomicina foi mantida na presença das cepas mutantes em *cph1* e *efg1*. No entanto, a bactéria foi sensível a vancomicina quando cultivada na presença do duplo mutante e na cepa mutante *bcr1*. Os mutantes de *C. albicans* não apresentaram diferenças na suscetibilidade à anfotericina B na presença da bactéria. Surpreendentemente, quando o biofilme de *C. albicans* foi inativado com anfotericina, *S. aureus* foi capaz de crescer em níveis semelhantes aos de quando o fungo estava viável. No entanto, quando foi utilizado formalina ou calor, *S. aureus* foi incapaz de formar biofilme no soro, apresentando níveis semelhantes aos níveis de crescimento em monocultura. Os autores ainda relataram que tanto a família de adesinas ALS como a adesina HWP1 não estavam envolvidas na adesão interespécies. Por conseguinte, concluíram que a formação de biofilmes polimicrobianos e

subsequente resistência a antibióticos é um processo multifatorial que pode necessitar de uma combinação única de adesinas fúngicas e/ou bacterianas.

De acordo com Peleg et al.[61], em 2010, apesar da abundância de interações fúngicas-bacterianas em diversos nichos do corpo humano, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes destas interações. Dessa forma, os autores objetivaram descrever os mecanismos moleculares e a importância médica de algumas interações entre bactérias e fungos que ocorrem no corpo humano. Devido à ampla distribuição da espécie fúngica *C. albicans*, tanto na pele quanto nas mucosas humanas, este fungo é mais frequentemente associado em interações polimicrobianas, e por isso, foi o principal foco dessa revisão. Os autores abordaram a influência direta ou indireta que os micro-organismos de um biofilme polimicrobiano exercem um sobre o outro, seja essa influência mutualística ou antagônica. Para os autores, a causa das diversas relações existentes entre as diferentes classes filogenéticas associadas foi a evolução de mecanismos complexos pelos micro-organismos, a fim de promoverem sua sobrevivência, defendendo-se não só contra as condições ambientais ou nutricionais adversas, mas também contra micro-organismos concorrentes. Desta forma, os autores ressaltam a importância de desvendar os mecanismos que os micro-organismos utilizam em um ambiente polimicrobiano, não apenas para aprofundar a compreensão sobre a patogênese microbiana, mas também para fornecer importantes percepções sobre novas vias de tratamento para a associação destes patógenos humanos.

Sabendo-se que a espécie fúngica *C. albicans* e a espécie bacteriana *S. aureus* são responsáveis por um grande número de infecções hospitalares e são frequentemente coisoladas em pacientes criticamente debilitados, Peters et al.[64], em 2010, avaliaram a interação dessas espécies por microscopia confocal. Além disso, estudos da expressão de proteínas também foram realizados, para melhor entender os mecanismos moleculares possivelmente responsáveis pela virulência amplificada desta coinfecção. Para isso,

suspensões padronizadas de *C. albicans* SC 5314 (OD 540 nm – 1,0) e um isolado clínico de *S. aureus* resistente à meticilina - MRSA (OD 600 nm – 0,1) foram utilizados. Para a formação dos biofilmes simples e mistos, uma placa de poliestireno de 6 poços contendo 5 mL de RMPI suplementado com soro fetal bovino foi utilizada. Os poços destinados a formação dos biofilmes mistos, além dos 5 mL de meio, foram acrescidos de 50 µL da suspensão de cada espécie e então, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Esse mesmo protocolo foi utilizado para o crescimento de biofilmes simples e mistos em lamínulas para análise da viabilidade dos biofilmes corados com o kit "*Live/Dead*", que cora as células vivas em verde (Syto 9) enquanto as células mortas são coradas em vermelho (iodeto de propídeo). Para os testes proteômicos, após as 24 horas da formação dos biofilmes, as placas foram posicionadas em um agitador durante 1 minuto, e então o sobrenadante das culturas foi descartado. Para a remoção dos biofilmes do fundo dos poços, 1 mL do tampão de lavagem (10 mM Tris, 5 mM acetato de Mg, pH 8,0) foi adicionado em cada poço e com um raspador de culturas celulares os biofilmes foram desprendidos. Em seguida, a disrupção mecânica das culturas celulares foi realizada, utilizando agitador e esferas de zircônia (0,1 mm). A extração e purificação das proteínas foi realizada através dos reagentes "*Advanced Protein Assay Reagent*" e "*Perfect-Focus reagente*", respectivamente, de acordo com as recomendações dos fabricantes. No ensaio de adesão bacteriana às hifas, calculado pelo número de células bacterianas aderidas às hifas, e dividido pelo número total de bactérias por campo microscópico, reportado por porcentagem, foi possível observar que *S. aureus* apresentou 56% de associação aos elementos fúngicos invasivos. Imagens de confocal utilizando sondas espécies-específicas revelaram uma extensa adesão de *S. aureus* à *C. albicans*, com uma associação preferencial às hifas. A associação do fungo e bactéria foi quantificada, e foi possível observar que a adesão de *S. aureus* às hifas foi 30 vezes maior que a adesão de *S. aureus* às formas leveduriformes. Imagens também mostraram que ambas as cepas estavam

viáveis ao fim das 24 horas de formação de biofilmes polimicrobianos, com uma aparente falta de fluorescência vermelha (iodeto de propídio). Vinte e sete proteínas importantes para o crescimento, metabolismo e aumento da virulência das duas espécies foram reguladas positivamente quando os micro-organismos foram cocultivados. Os autores concluíram, com base nos resultados, que a patogenicidade aumentada de *S. aureus*, mediada pela ligação com as hifas, não é apenas devido às interações físicas, mas também pode ser atribuída à regulação diferencial de fatores de virulência específicos induzidos durante o crescimento polimicrobiano.

C. albicans é o patógeno fúngico humano mais prevalente, com capacidade de habitar diferentes nichos do corpo humano, causando doenças principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, este fungo também é capaz de formar biofilmes em dispositivos médicos internos, os quais passam a ser um reservatório infeccioso, de difícil erradicação, podendo levar a infecções sistêmicas letais. No entanto, *C. albicans* raramente forma biofilmes mono-espécies no corpo humano, ao contrário disso, a coagregação deste fungo com outras espécies fúngicas e, até mesmo bacterianas, vem ganhando destaque na literatura. A interação entre micro-organismos foi o foco da revisão de Harriott, Noverr[37], em 2011. Os autores avaliaram a importância clínica de modelos de infecção polimicrobiana "*in vitro*" e "*in vivo*" em infecções vaginal, oral, gastrointestinal, infecções dos pulmões e feridas da pele. De acordo com os autores, dependendo das espécies que compõem cada biofilme, a natureza das interações polimicrobianas pode variar entre mutualística, sinérgica e antagônica. Um biofilme polimicrobiano que recebeu enfoque, pela sua relação sinérgica, foi aquele formado entre o patógeno eucariótico *C. albicans* e o patógeno procariótico *S. aureus*. Segundo os autores, esses micro-organismos interagem de forma que a bactéria adere preferencialmente às hifas fúngicas, fenômeno este que é dependente da presença da adesina ALS3 ("*agglutinin-like sequence 3*"). Além disso, quando esses micro-organismos estão

associados apresentam maior virulência, demostrada através de 100% de mortalidade de camundongos coinfectados, e maior resistência tanto às defesas do hospedeiro, quanto às terapias medicamentosas. Por fim, os autores reconhecem o importante papel dos modelos animais, para avaliar as interações microbianas, mas ressaltam a importância de avaliar a virulência dessas interações exatamente no local e no hospedeiro que elas ocorrem, pois é provável que a imunidade específica de cada hospedeiro determine como os micro-organismos reagirão dentro de cada microambiente.

Com o propósito de demonstrar a relação sinérgica que existe entre *C. albicans* e *S. aureus*, crescidos em biofilmes mistos, Ibarra-Trijillo et al.[41], em 2012, utilizaram dois isolados clínicos, um de cada espécie, ambos provenientes de um paciente com estomatite protética de difícil tratamento, e duas cepas de referência (*C. albicans* ATCC 90028 e *S. aureus* ATCC 25923). Biofilmes simples e mistos foram formados em placas de poliestireno de 96 poços. Para a formação de biofilmes simples, 150 µL das suspensões padronizadas em RPMI de cada espécie foram utilizados. Já os biofilmes mistos foram formados pela mistura de 75 µL da levedura acrescidos de 75 µL da bactéria. As placas foram incubadas a 37°C por diferentes períodos de tempo (30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas). Os biofilmes foram quantificados através da atividade metabólica (ensaio de XTT) e da viabilidade celular por microscopia confocal utilizando o kit "*Live/Dead*". Os isolados clínicos de *C. albicans* e *S. aureus*, crescidos em biofilmes simples, apresentaram atividade máxima no período de 12 horas, enquanto atividade máxima das cepas ATCC foi observada às 24 horas. Biofilmes mistos também tiveram atividade máxima no período de 24 horas. De forma geral, biofilmes mistos apresentaram maior atividade metabólica, seguido pelos valores da atividade de biofilmes simples de *C. albicans*, que apresentaram maior atividade quando comparado a biofilmes simples de *S. aureus*. Com as imagens de fluorescência, foi possível observar que os biofilmes mistos ocuparam a totalidade da superfície às 24 horas, alcançando maior

complexidade estrutural e maturidade às 48 horas. Uma vez que a atividade metabólica e o crescimento de biofilmes mistos foram significativamente maiores e mais complexos quando comparados aos biofilme simples, os autores sugeriram que há uma relação sinérgica entre estes patógenos, podendo resultar em aumento da virulência desses biofilmes polimicrobianos.

Apesar da adesão preferencial de *S. aureus* às hifas de *C. albicans* ter sido bem evidenciada na literatura, nenhum dos estudos que observaram essa preferência avaliaram as possíveis diferenças nas forças de adesão estafilocócicas ao longo do comprimento das hifas. Tendo isto em mente, Ovchinnikova et al.[57], em 2012, verificaram, pela primeira vez, a hipótese de que a força de adesão de *S. aureus* é variável dependendo da região da hifa e diferente da parte germinativa (blastóporos). Os autores utilizaram cepas selvagens de *C. albicans* SC 5314 e *S. aureus* NCTC8325-4 para a formação dos biofilmes em placas de poliestireno de 12 poços a 37°C. Após a formação dos biofilmes, microscopia de força atômica foi utilizada para quantificar a força de adesão entre os dois patógenos em diferentes regiões do fungo. Para isto, as hifas foram virtualmente divididas em três regiões: 1- extremidade (parte mais jovem das hifas), 2- meio, e 3- região nomeada “cabeça” (próximo a célula leveduriforme, a partir da qual começou a germinação). A maioria das bactérias aderiram na extremidade e na região média das hifas, ao passo que adesão na região da “cabeça” das hifas e na célula germinativa dificilmente foi observada. Além da quantidade, forças de adesão mais intensas também foram reportadas na extremidade e região média das hifas (por volta de 4,0 nN) quando comparado com a intensidade de adesão na região da “cabeça” (0,5 nN). Os autores concluíram que essas diferenças entre intensidades de forças de adesão de *S. aureus* ao longo do comprimento das hifas pode ser justificada por diferenças na constituição da parede celular, que além de ser duas vezes mais fina na extremidade das hifas, também é mais hidrofóbica quando comparada à célula germinativa. Além disso, proteínas da

parede celular, como ALS3, foram expressas exclusivamente ao longo das hifas e não na região da “cabeça” ou na célula germinativa.

Como estudos anteriores demonstraram uma associação preferencial de *S. aureus* com as hifas de *C. albicans* em biofilmes mistos, Peters et al.[66], em 2012, caracterizaram o mecanismo molecular envolvido nessa interação. Para isto, cepas mutantes de *C. albicans* deficientes de adesina foram selecionadas por microscopia, com o intuito de identificar o receptor específico reconhecido por *S. aureus* nas hifas de *C. albicans*. Além disso, foi desenvolvido um imunoensaio para validar e quantificar a adesão estafilocócica aos biofilmes fúngicos. Os resultados deste estudo definiram a adesina ALS3 como importante receptor para desempenhar esse processo de adesão. Esta associação também foi quantitativamente estabelecida, utilizando microscopia de força atômica, na qual a força de adesão da bactéria às hifas fúngicas foi significativamente reduzida para a estirpe de *C. albicans* mutante com ausência de ALS3. Esses resultados ainda foram confirmados pelas imagens de microscopia confocal. Além disso, os autores também utilizaram uma estirpe de *S. cerevisiae* que expressou heterologamente ALS3 para confirmar o papel desta adesina como um receptor para *S. aureus*. Apesar das bactérias não aderirem à estirpe parental de *S. cerevisiae,* quando foi conferido à esta levedura a capacidade de expressar ALS3 na superfície celular, *S. aureus* foi capaz de se ligar fortemente à levedura. Ainda com o intuito de elucidar as implicações destes resultados “*in vitro*” em um cenário clinicamente relevante, um modelo de coinfecção “*ex vivo*” foi concebido a partir de línguas de camundongos. Imagens de microscopia de fluorescência revelaram uma extensa penetração de hifas no epitélio, típico de infecção mucosas por *C. albicans*. Curiosamente, as bactérias só foram observadas dentro do tecido epitelial quando associadas às hifas fúngicas. Contrariamente, a presença de *S. aureus* estava limitada às camadas exteriores do tecido oral nas imagens das línguas infectadas com culturas simples ou naquelas onde a bactéria estava em conjunto com a estirpe de *C. albicans* mutante

com ausência de ALS3. Os resultados deste estudo identificaram a adesina ALS3 de *C. albicans* como um receptor importante para mediar a interação clinicamente relevante entre *C. albicans* e *S. aureus*.

Devido a atividade antimicrobiana, segurança, estabilidade e acessibilidade do etanol (EtOH), Peters et al.[67], em 2013, testaram a hipótese de que este agente pudesse servir como uma solução potencialmente eficaz no controle contra biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus*, formado sobre cateteres. Para isto, biofilmes mono e polimicrobianos foram formados em placas de poliestireno de 96 poços e também sobre discos estéreis de silicone. Os biofilmes monomicrobianos foram formados pela adição de 50 µL da cultura previamente padronizada (10^6 cel/mL) de cada micro-organismo, acrescido de 50 µL de meio TSB ("*Trypticase soy broth*"). Para os biofilmes polimicrobianos, 50 µL da cultura previamente padronizada ($1x10^6$ cel/mL) de cada micro-organismo foi utilizado (50 µL de *C. albicans* + 50 µL de *S. aureus*). Em seguida as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a formação dos biofilmes, 100 µL de diferentes concentrações de EtOH (5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%) foram adicionadas sobre os poços e incubados a 37°C por diferentes períodos de tempo (0,5, 2, 4, 24 horas). Os biofilmes tratados com EtOH foram analisados pelos métodos de UFC/mL, XTT, cristal violeta, e microscopia confocal utilizando o kit "*Live/Dead*". Além disso, os autores também avaliaram a recolonização dos discos de silicone por biofilmes mono e polimicrobianos após o tratamento com EtOH. Como evidenciado pelo ensaio de atividade metabólica (XTT) e pela microscopia confocal, o tratamento com EtOH a 30% durante um período mínimo de 4 horas foi capaz de inibir os biofilmes mono e polimicrobianos crescidos tanto em placa de polietireno quanto em discos de silicone. Os experimentos para avaliar a recolonização dos micro-organismos após o tratamento com EtOH mostraram que incubação com EtOH a 30% durante 4 horas foi suficiente para matar e inibir o crescimento de *C. albicans*, ao passo que para a completa inibição da recolonização

das superfícies pelos biofilmes mono e polimicrobianos com *S. aureus* foi necessário a utilização do EtOH a 50%. Em resumo, este artigo definiu sistematicamente a dose e duração do tratamento com EtOH que são eficazes contra e para prevenir a recolonização de biofilmes mono e polimicrobianos de *C. albicans* e *S. aureus* em modelo "*in vitro*".

A fim de avaliar os efeitos patológicos diferenciais em um hospedeiro durante infecções mono e polimicrobianas com os patógenos *C. albicans* e *S. aureus*, comumente coisolados nos quadros de peritonite, Peters, Noverr[68], em 2013, aperfeiçoaram um modelo de peritonite em camundongos. Para isso, os camundongos foram injetados intraperitonialmente com 0,2 mL de *C. albicans* ($3,5x10^7$ cel/mL) ou com 0,2 mL de *S. aureus* ($4x10^8$ cel/mL) para as infecções monomicrobianas. Para as infecções polimicrobianas, os camundongos foram inoculados com 0,2 mL contendo $3,5x10^7$ cel/mL de fungo e $4x10^8$ cel/mL da bactéria. Os camundongos foram observados por um período de 5 dias pós-infecção. Os autores observaram que a inoculação dos camundongos com culturas isoladas do fungo ou bactéria não foi letal, e os camundongos apresentaram 100% de sobrevivência, além de uma aparência semelhante aos animais do grupo controle (inoculados apenas com salina). No entanto, coinoculação com a mesma dose dos micro-organismos levou a 40% de mortalidade, além de um aumento da carga microbiana no baço e rim em apenas um dia pós-infecção. Utilizando um imuno ensaio multiplex, os autores verificaram um aumento significativo da citocina pró-inflamatória (IL-6) durante infecções polimicrobianas, o que causou um aumento do infiltrado inflamatório no peritônio e órgãos-alvo. O tratamento dos camundongos com inibidor de cicloxigenase (COX) indometacina reduziu a carga microbiana, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o infiltrado inflamatório, evitando simultaneamente, qualquer mortalidade dos camundongos inoculados. Os autores também demonstraram que o eicosanóide imunomodulador, prostaglandina E2 (PGE2), é sinergicamente aumentado durante a coinfecção em comparação com infecção monomicrobianas. O tratamento com indometacina

também diminuiu os níveis elevados de PGE2. Além disso, a adição de PGE2 exógena na cavidade peritoneal durante a infecção cancelou a proteção fornecida pela indometacina e resultou no aumento de carga microbiana e mortalidade. É importante ressaltar que esses testes destacam a capacidade de coinfecções fúngica-bacteriana modularem eventos inflamatórios inatos, com consequências devastadoras para o hospedeiro.

Para Wolcott et al.[97], em 2013, os biofilmes adquirem numerosas vantagens com a inclusão de várias espécies de bactérias e/ou fungos em uma única comunidade, como resistência passiva, cooperação metabólica, sistemas de detecção por quorum-sensing, e uma ampla gama de genes com compartilhamento eficiente de DNA. Para os autores, de uma forma geral, quanto maior a diversidade, ou seja, quanto maior o conjunto de genes, mais robusto é o biofilme em termos da sua capacidade de sobrevivência. No entanto, os micro-organismos podem combinar os seus recursos genéticos, de modo que cada um dos membros não precise expressar todos os genes necessários para realizar cada função. Dessa forma, o compartilhamento dos genes pelas espécies que compõem o biofilme permite que cada membro gaste menos energia, mantendo sua contribuição para o conjunto total de genes necessários a toda comunidade. Uma vantagem que os micro-organismos que compõem biofilmes polimicrobianos podem apresentar é a resistência passiva, que ocorre quando um dos membros do biofilme possui um fator de resistência, que pode proteger os outros membros que não apresentam o mesmo fator. Outra vantagem para os micro-organismos é a transferência horizontal de genes, a qual mantém a complexidade genômica dos biofilmes. Na verdade, os autores sugerem que o biofilme é uma entidade única que exerce um controle central sobre os membros individuais para produzir as atividades necessárias para a sobrevivência coletiva.

Alves et al.[8], em 2014, avaliaram o processo de infecção de um epitélio vaginal humano reconstituído (EVHR) por culturas simples e mistas de *C. albicans* e *C. glabrata*.

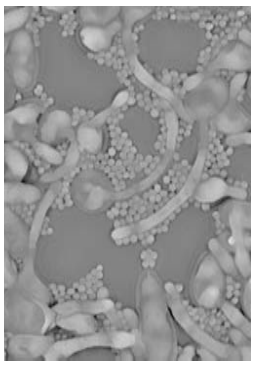
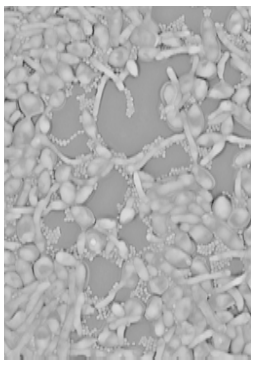
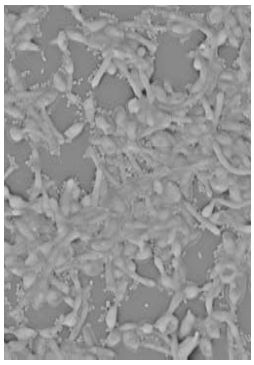
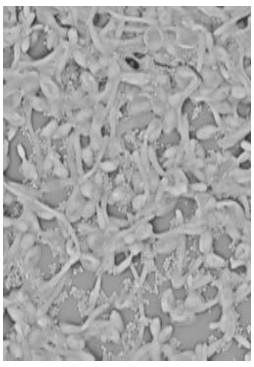
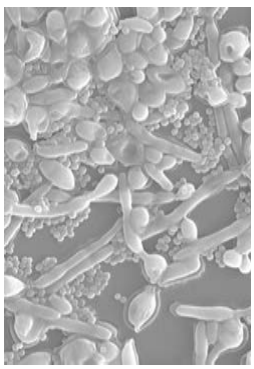
Isolados clínicos provenientes da cavidade oral (*C. albicans* 324LA/94 e *C. glabrata* D1) e da mucosa vaginal (*C. glabrata* 585626) foram utilizados juntamente com cepas padrão das duas estirpes (*C. albicans* ATCC 90028 e *C. glabrata* ATCC 2001). Infeções simples do tecido, foram realizadas com 1 mL da suspensão de cada cepa, previamente padronizada ($2x10^6$ cel/mL). Já as infecções mistas foram realizadas com 500 µL de cada espécie. Em seguida, os tecidos foram incubados a 37°C por 24 horas em incubadora com 5% de CO_2 e umidade saturada. O padrão de colonização e invasão do EVHR pelas infecções simples e mistas dos micro-organismos foi avaliado utilizando hibridização "*in situ*" (PNA-FISH) com sondas espécies-específicas, microscopia confocal e um método de quantificação de *Candida* no tecido. Além disso, o dano tecidual foi avaliado pela quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada. Adicionalmente, a expressão de genes de virulência (*HWP1*, *ALS*, *EPA*, *PLB*, *PLD* and *SAP*) dos isolados foi avaliada por PCR em tempo real (RT-qPCR). Os resultados mostraram que, enquanto ambas espécies induziram danos no epitélio, quando comparado ao grupo controle, o dano foi notavelmente menor nas infecções por *C. glabrata*. Um aumento significativo da colonização e invasão do EVHR por *C. glabrata* foi observado durante a presença de *C. albicans*. A extensão dos danos causados no EVHR pelas duas espécies pareceu ser primariamente dependente do processo de invasão. Dos genes de virulência avaliados, *HWP1*, *PLD1* e *ALS3* foram os mais associados à patogenicidade das espécies nesse modelo epitelial. Com base nos resultados, os autores concluíram que *C. albicans* aumenta a colonização, invasão e dano tecidual de *C. glabrata*, igualmente evidenciado pela maior expressão dos genes de virulência.

Em 2014, Demuyser et al.[26] realizaram uma revisão de literatura abrangendo as proteínas das superfícies microbiana, bem como os metabólitos secretados durante interações polimicrobianas. Além disso, os autores abordaram ferramentas e técnicas disponíveis capazes de fornecerem percepções sobre o papel dessas proteínas de superfície.

Especificamente, os autores concentraram nas interações mutualísticas, sinérgicas e antagônicas que ocorrem nos biofilmes orais e as implicações destas interações sobre as estratégias terapêuticas na saúde bucal. O papel de adesinas de *C. albicans*, como ALS3 e HWP1, na adesão, formação de biofilme, bem como na coadesão bacteriana, sobretudo com a espécie de *S. aureus*, recebeu destaque nesta revisão. Segundo os autores, moléculas da superfície celular são idealmente situadas para interagir com substratos bióticos ou abióticos, e também com outras espécies microbianas, constituindo portanto, alvos potenciais para a inibição da coadesão e consequentemente, do impacto das doenças polimicrobianas na saúde humana. Desta forma, uma compreensão mais detalhada das interações envolvidas nos biofilmes polimicrobianos pode proporcionar novas perspectivas para a concepção de estratégias para evitar a interação entre espécies.

De modo a determinar as implicações "*in vivo*" da interação *C. albicans* - *S. aureus*, dependente da presença de ALS3, Schlecht et al.[76], em 2015, desenvolveram um novo modelo de coinfecção em camundongos para demonstrar o potencial da progressão da cocolonização da mucosa oral para uma doença sistêmica disseminada. Para isso, os autores utilizaram cepas parentais de *C. albicans* SC 5314, e uma cepa mutante deficiente de ALS3; além de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina mutantes com ausência de algumas adesinas. Camundongos imunossuprimidos com injeções subcutâneas de cortisona, após anestesia, receberam administração oral de suspensões padronizadas do fungo, da bactéria, ou da combinação dos dois patógenos. Após o sexto dia de infecção, os animais que sobreviveram foram eutanasiados e a língua e os rins foram retirados. Análises da quantificação da carga microbiana (UFC/mL) e de microscopia confocal foram procedidas. *S. aureus* aderiu firmemente às hifas que expressavam *ALS3*, e de maneira mais fraca às hifas das cepas mutantes com ausência de *ALS3*. As imagens de microscopia revelaram que não houve invasão do epitélio oral por *S. aureus*, quando inoculado isoladamente ou na presença

de *C. albicans* mutante com ausência de *ALS3*. Além disso, não houve diferença significativa no número de UFC/mL de *C. albicans* recuperada da língua dos camundongos, independentemente da estirpe utilizada e da presença da bactéria. Este dado evidenciou que a colonização por *C. albicans* não é influenciada pela ausência de ALS3. Nos modelos de coinfecção, os animais apresentaram sinais de infecções sistêmicas, com exceção daqueles que foram inoculados com a cepa mutante ausente de ALS3, em que além de não terem sido visualizados sinais de infecção sistêmica, a maioria (83%) dos animais sobreviveu até a conclusão do experimento. Sintomas clínicos indicando infecção sitêmica foram corroborados com o recolhimento de *C. albicans* e *S. aureus* no rim dos camundongos, quando coinoculados com a cepa fúngica que expressava *ALS3*. Nenhuma bactéria foi encontrada no rim de camundongos inoculados individualmente com bactérias ou na presença de *C. albicans* com ausência de ALS3. Dessa forma, os autores concluíram que a cocolonização da mucosa oral por *C. albicans* e *S. aureus* em animais imunocomprometidos pode levar a infecções sistêmicas com elevadas taxas de morbidade e mortalidade.

Proposição

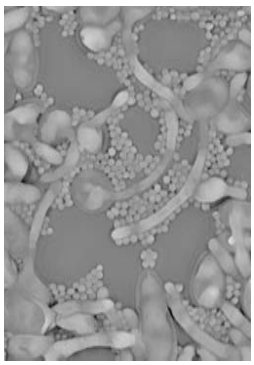
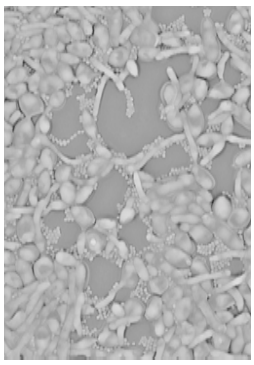
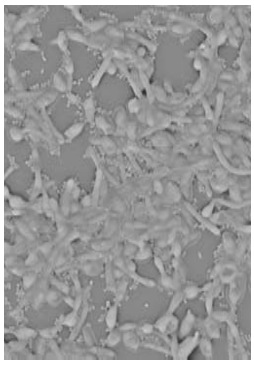
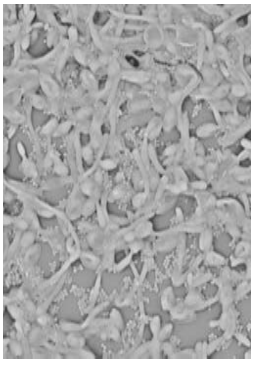
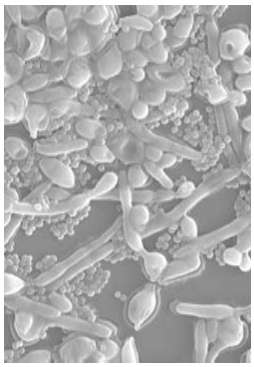
3 Proposição

Com base nas informações obtidas da literatura, os objetivos desta investigação foram avaliar a:

1. Relação de biofilmes simples e mistos de *C. albicans*, *S. aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA) com relação à capacidade de adesão, formação de biofilme e produção de enzimas degradativas específicas (proteinase e fosfolipase-C);

2. Colonização, dano e invasão do tecido epitelial oral reconstituído (EOHR) por culturas simples e mistas de *C. albicans*, *S. aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA);

3. Expressão de genes de virulência específicos em culturas simples e mistas de *C. albicans* (*ALS3*, *HWP1*), *S. aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA) (*clfA*, *clfB*, *ssp*, *pl-C*) formados sobre superfícies abiótica (placa de poliestireno) e biótica (EOHR).

Material e Método

4 Material e Método

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentos e equipamentos:

4.1 Material

1. Acetona P.A.-A.C.S. (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
2. Ácido Acético (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
3. Água destilada;
4. Água livre de RNAases (Promega, Madison, WI, EUA);
5. Água mili-Q;
6. Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil);
7. Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
8. Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
9. Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
10. Cubeta de 4,5 mL (Cartel, SP, Brasil);
11. Cultura de *C. albicans* (SC 5314 - Spanish Collection);
12. Cultura de *S. aureus* methicillin-susceptible (MSSA - ATCC 25923 - American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA);
13. Cultura de *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA – ATCC 33491 - American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA);
14. Esferas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
15. Etanol PA (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
16. Fluoróforo SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Berkeley, CA, EUA);

17. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL (Cral, Cotia, SP, Brasil);
18. Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
19. Hoechst 33258 dye (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
20. Kit CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Madison, WI, EUA);
21. Kit fluorimétrico Amplex Red® phosphatidylcholine-specific phospholipase C assay (Molecular Probe, Eugene, OR, EUA);
22. Kit fluorimétrico EnzChek® Protease Assay E6638 (Molecular Probe, Eugene, OR, EUA);
23. Kit GRS Genomic DNA Kit – Tissue (GRiSP, Porto, Portugal);
24. Kit High Capacity cDNA (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EUA);
25. Kit RNeasy Mini (Quiagen, Hilden, NW, Germany);
26. Lâminas Histobond+ (Raymond A Lamb, Eastbourne, Reino Unido);
27. Meio de cultura Mannitol Salt Agar (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
28. Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis , MO, EUA);
29. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com clorofenicol (Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
30. Meio de cultura Trytic Soy Broth (TSB - Acumedia Manufactures, Baltimore, MD, EUA);
31. Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA);
32. Meio de cultura Yeast-Peptone-Glucose (YPD - 1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% D-glucose, 2% agar) (Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, EUA);
33. Menadiona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
34. Metanol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
35. Microtubos tipo Eppendorfs Graduado (Axygen, Curitiba, PR, Brasil);

36. Óleo de montagem (Vectashield - Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido);
37. Parafilme (Laboratory Film, Chicago, IL, EUA);
38. Paraformaldeido (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
39. Placas de 24 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
40. Placas de 96 poços de fundo chato e estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
41. Placas de 96 poços específica para testes de fluorescência (Greiner Bio ONE, Frickenhausen, Germany);
42. Placas de 24 poços com Epitélio Oral Humano Reconstituído (EOHR - ShinEthic Laboratories, Paris, França);
43. Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
44. Pó de Cristal Violeta (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil);
45. Ponteiras brancas para micropipeta 10 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
46. Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
47. Ponteiras azuis para micropipeta 100-1000 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
48. Ponteiras para micropipeta 5 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
49. Ponteiras para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA);
50. Primers (Metabion International AG, Martinsried, Deutschland, Alemanha);
51. Sal de Tetrazólium (XTT - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
52. Sistema de filtração a vácuo estéril (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);

53. Sondas de DNA espécies-específicas (PNABio - Thousand Oaks, CA, EUA);
54. Solução de lisozima (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
55. Trizma® hydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
56. Tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).

4.2 Instrumentos

1. Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
2. Bico de Bunsen (J.Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil);
3. Bisturi (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
4. Erlenmeyer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil);
5. Micropipeta de 0,1-10 µL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
6. Micropipeta de 20-200 µL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
7. Micropipeta de 100-1000 µL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
8. Micropipeta de 1-5 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
9. Micropipeta de 1-10 mL (Boeco, Hamburgo, Alemanha);
10. Micropipeta Multicanal Discovery Comfort, 12 Canais, 50-300 µL (HTL, Warsaw, Polônia);
11. Pinça clínica (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
12. Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

4.3 Equipamentos

1. Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
2. Agitador magnético Modelo: 78HW-1 (Andrade's Comércio e materiais Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
3. Autoclave vertical Modelo: AV 60 No 6614 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
4. Balança de precisão Modelo: BG 400 No 016450 (Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil);
5. Bomba a vácuo (Fanen, São Paulo, SP, Brasil);
6. Câmara de fluxo laminar vertical, Modelo: PA 115. No. 12898 (Pachane Ind. e Com. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil);
7. Centrífuga de microtubos Modelo: 2410 (Fanem, São Paulo, SP, Brasil);
8. Centrífuga de tubos Falcons Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha);
9. Contador de colônias Modelo: CP 600 Plus (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil);
10. Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil);
11. Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
12. Estufa de CO_2 Modelo:L212 (Laboven, Qingdao, China);
13. Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, SP, Brasil);
14. Freezer -80°C (Thermo Scientific, EUA);
15. Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);

16. Leitor de Microplacas Fluoroskan Ascent™ microplate fluorometer (Thermo Scientific, EUA);
17. Leitora de Microplacas TP Reader-Basic (ThermoPlate, São Paulo, SP, Brasil);
18. Micro-ondas Brastemp Crisp 27 (Brastemp, Manaus, AM, Brasil);
19. Microscópio - Tablelap Scanning Electron Microscope Modelo: TM-3000 (Hitachi,Tokyo, Japan);
20. Microscópio de fluorescência Modelo: BX51 (Olympus, Tókio, Japão);
21. Mini-Beadbeater-8 (Stratech Scientific, Soham, Reino Unido);
22. NanoDrop 1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific (Detroit, MI, EUA);
23. pHmetro (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil);
24. RT-qPCR ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, EUA);
25. Termociclador Mastercycler Gadient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).

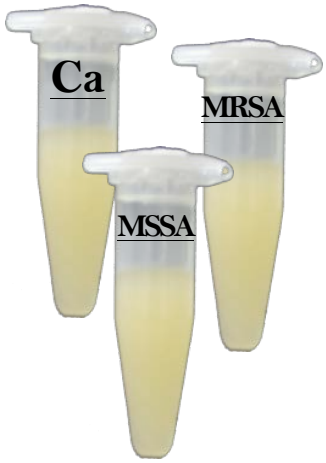
4.4 Métodos

4. 4. 1 Micro-organismos e condições de armazenamento

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas três cepas de referência: *C. albicans* "wild-type" (Ca - SC 5314), um isolado clínico humano obtido junto à "*Spanish Collection*" e selecionado devido à sua elevada capacidade de crescer na forma de hifas[39], e duas cepas bacterianas obtidas junto à "*American Type Culture Collection*", *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA - ATCC 25923) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA - ATCC 33591), selecionadas por serem capazes de formar biofilme "*in vitro*" [7,86]. Além disso, esses três micro-organismos foram selecionados porque já foram utilizados em outras investigações que avaliaram a interação *Candida-Staphylococcus* em biofilmes[35,36,41,64]. Até o momento de sua utilização, os micro-organismos ficaram congelados e estocados a -70°C

(Figura 1). A cepa de origem fúngica foi mantida em meio de cultura YEPD – "*Yeast-Peptone-Glucose*" (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% D-glucose, 2% agar), enquanto as cepas bacterianas foram estocadas em meio de cultura "*Tryptic Soy Broth*" – TSB.

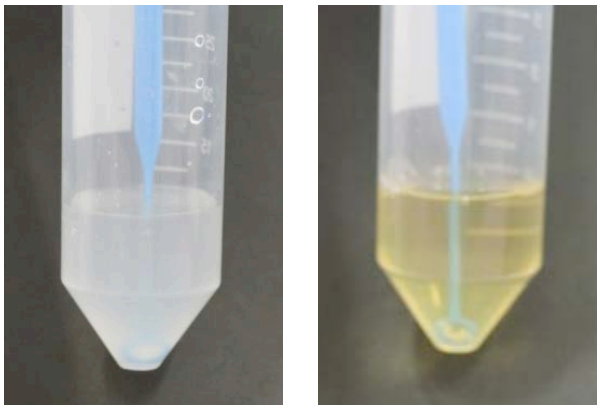
Figura 1 - Estoque dos micro-organismos congelados.



4. 4. 2 Reativação e condições de cultivo dos micro-organismos

Previamente à sua utilização, os micro-organismos foram descongelados. Para isso, as cepas foram individualmente semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura específicos: "*Sabouraud Dextrose Agar*" (SDA) com cloranfenicol para *C. albicans* e "*Mannitol Salt Agar*" para MSSA e MRSA. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 37ºC por 48 horas. Após o período de incubação, cinco a sete colônias dos micro-organismos recém cultivados foram transferidas para os meios YNB com 100 mM de glicose (*C. albicans*) ou TSB (MSSA e MRSA) (Figura 2) e incubadas *"overnight"* a 37ºC sob agitação de 75 rpm.

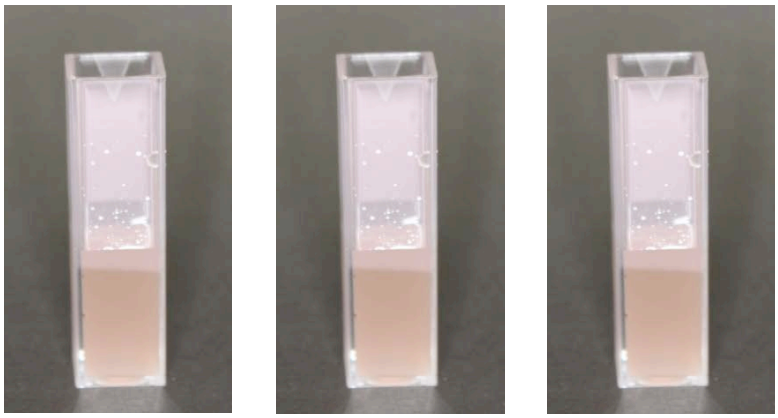
Figura 2 - Preparo dos micro-organismos para crescimento "*overnight*" (meios YNB e TSB para *C. albicans* e bactérias, respectivamente).



YNB **TSB**

As células das culturas resultantes foram lavadas duas vezes com solução salina divisora de fosfato estéril (PBS; NaCl 100 mM, NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,2) e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos. Os micro-organismos lavados foram ressuspendidos em meio RPMI 1640. Suspensões de *Candida* e *Staphylococcus* foram padronizadas espectrofotometricamente a uma densidade óptica de 1,0 (540 nm) e a uma densidade óptica de 0,1 (600 nm) respectivamente, correspondendo a uma concentração final de 10^7 células/mL[64]. Essas suspensões padronizadas foram utilizadas em todos os testes de quantificação dos biofilmes, tanto simples quanto mistos (Figura 3).

Figura 3 - Suspensões dos micro-organismos padronizadas (10^7 células/mL) espectrofotometricamente.



C. albicans **MSSA** **MRSA**

4. 4. 3 Adesão e formação de biofilme

Os ensaios de adesão e formação de biofilme para culturas simples foram realizados em placas de cultura pré-estéreis de 96 poços contendo 75 μL de meio RPMI 1640 e 75 μL de cada suspensão celular previamente padronizada na concentração de 10^7 células/mL, totalizando 150 μL. Os ensaios de culturas mistas também foram realizados em placas de cultura pré-estéreis de 96 poços, por meio da inoculação de 75 μL de suspensão de cada micro-organismo (*C. albicans* + MSSA e *C. albicans* + MRSA), previamente padronizadas na concentração de 10^7 células/mL, também totalizando 150 μL (Figura 4). Todas as placas foram incubadas por 90 minutos (fase de adesão)[21] a 37ºC sob agitação a 75 rpm.

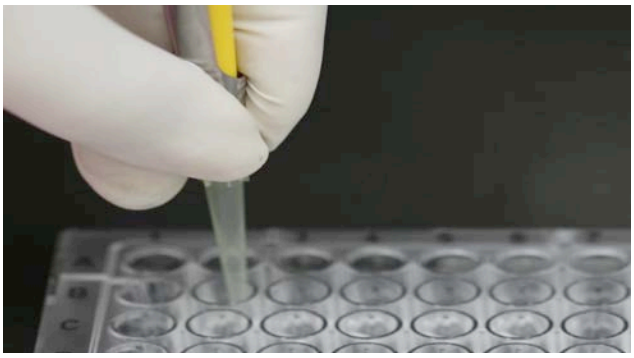
Figura 4 - Placa de 96 poços utilizada para os testes de adesão e formação de biofilmes simples e mistos.

Após esse período, os poços foram lavados cuidadosamente com 150 µL de PBS estéril. Essa lavagem foi realizada duas vezes com a função de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos. Em seguida, 150 µL de meio RPMI 1640 fresco foram acrescentados em cada poço, e então, as placas foram incubadas por 12, 24 e 48 horas. No caso dos biofilmes de 48 horas, 75 µL das suspensões foram removidos e um volume igual de meio RPMI 1640 fresco foi adicionado após as primeiras 24 horas. A capacidade de adesão foi avaliada pelos seguintes métodos: quantificação do número de células aderidas por meio da contagem do número de colônias viáveis em meios específicos e análise da atividade metabólica por meio do ensaio de XTT. Já a capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelos mesmos métodos utilizados na capacidade de adesão, acrescido da quantificação da biomassa total, por meio do corante cristal violeta. É importante enfatizar que os métodos de avaliação foram realizados em três ocasiões distintas, com cinco réplicas para cada condição experimental.

Contagem do número de colônias viáveis

Para a quantificação das células da fase de adesão e dos biofilmes simples e mistos, os poços foram lavados cuidadosamente com 150 μL de PBS estéril a fim de remover as células não aderidas e ressuspendidos em 100 μL de PBS. Depois disso, as células aderidas foram removidas do fundo dos poços por meio de raspagem com a ponta de pipeta estéril, durante um minuto[79] (Figura 5).

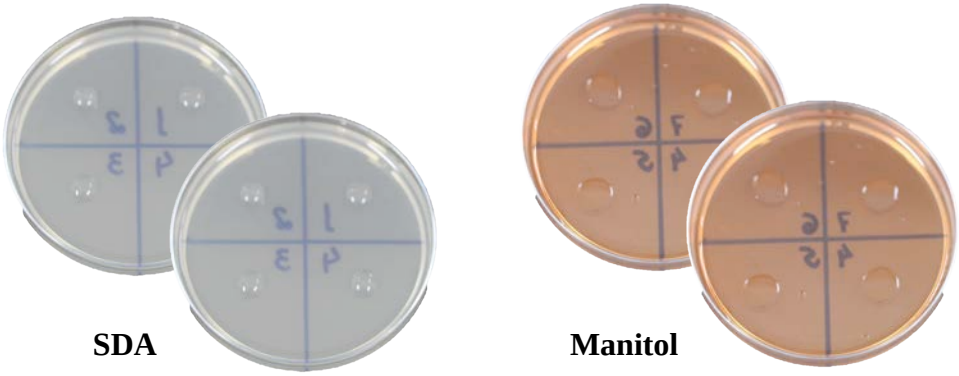
Figura 5 - Remoção das células da fase de adesão e dos biofilmes simples e mistos, com ponta de pipeta estéril.



Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em PBS estéril por meio da transferência de 100 μL da solução original para tubos contendo 900 μL da mesma solução. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} (para *C. albicans*) e 10^{-1} a 10^{-7} (para bactérias) foram obtidas e uma alíquota de 25 μL de cada diluição foi semeada, em duplicata, em um dos quadrantes de uma placa de Petri contendo meios de cultura específicos, de acordo com a condição experimental: SDA com cloranfenicol para *C. albicans*, Mannitol para MSSA e MRSA, e ambos os meios para experimentos com culturas mistas (Figura 6). A seguir, todas as placas foram incubadas a 37ºC por 48 horas. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias digital e o número de colônias determinado. Os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados de

acordo com a seguinte fórmula: UFC/mL = número de colônias x 10^n / q. Nessa fórmula, *n* equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 1 a 4 para *C. albicans* ou 4 a 7 para MSSA e MRSA) e *q* equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (0,025 mL = 25 μL).

Figura 6 - Alíquotas de *C. albicans* e MSSA/MRSA plaqueadas em placas de Petri com meio específico (SDA + cloranfenicol e Manitol, respectivamente).



SDA **Manitol**

Ensaio de XTT

O ensaio de XTT avaliou a presença de micro-organismos por meio da atividade metabólica das células. O teste com XTT baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de micro-organismos metabolicamente ativos converterem o sal tetrazólio XTT (cor amarela) em um produto solúvel em água - formazana (cor laranja), o que é mensurado em espectrofotômetro[60,80]. A solução de XTT foi obtida utilizando-se água ultra-pura a uma concentração de 1 mg/mL e mantida a -70°C até o momento dos experimentos. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM imediatamente antes de cada experimento. A solução de XTT utilizada em todos os experimentos consistiu de PBS com 200 mM de glicose, solução de XTT previamente preparada e menadiona, na seguinte proporção: 158 μL, 40 μL e 2 μL, respectivamente. Para o ensaio, 200 μL da solução de XTT foram adicionados em cada orifício das placas utilizadas nos testes anteriormente descritos, as quais foram

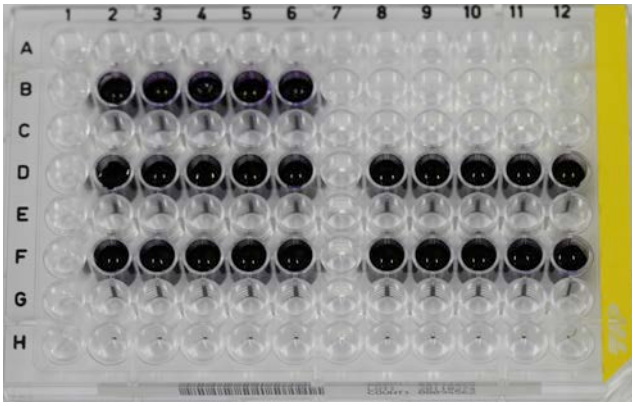
incubadas a 37°C por 3 horas no escuro (Figura 7). O resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro de 492 nm[80].

Figura 7 - Placa com solução de XTT incubada a 37°C no escuro.

Quantificação da biomassa total (coloração cristal violeta)

Esse método foi utilizado para determinar a biomassa total dos biofilmes simples e mistos[79]. Para isso, os biofilmes previamente lavados foram fixados com 200 μL de metanol durante 15 minutos. O metanol foi removido e as placas foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos para secagem. Em seguida, 200 μL de corante cristal violeta 1% foi adicionado e mantido por 5 minutos (Figura 8). Cada orifício da placa foi lavado com PBS e, em seguida, foi adicionado ácido acético 33% para remoção do corante. O resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro de 570 nm[79].

Figura 8 - Placa com corante cristal violeta adicionado sobre biofilmes simples e mistos.



4. 4. 4 Quantificação de enzimas degradativas específicas

Para os testes de síntese de enzimas degradativas (SAP e PL-C), os biofilmes simples e mistos foram formados em placas de cultura de 24 poços. Para a formação de biofilmes simples, foram utilizados 750 μL de meio RPMI 1640 e 750 μL de cada suspensão celular previamente padronizada na concentração de 10^7 células/mL. Para a formação dos biofilmes mistos, foram utilizados 750 μL da suspensão de cada micro-organismo (*C. albicans* + MSSA e *C. albicans* + MRSA), também previamente padronizadas na concentração de 10^7 células/mL. Em seguida, as placas foram incubadas por 90 minutos a 37ºC sob agitação a 75 rpm. Após esse período, os poços foram lavados cuidadosamente com 1500 μL de PBS estéril, 1500 μL de meio RPMI 1640 fresco foram acrescentados em cada poço e, então, as placas foram incubadas por 48 horas. Após esse período, os sobrenadantes dos biofilmes simples e mistos foram utilizados para avaliar a atividade enzimática através da quantificação de proteinase utilizando o kit fluorimétrico "*EnzChek® Protease Assay*", de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 9). Brevemente, 200 μL da solução de estoque de caseína ("*BODIPY*" – 1,0 mg/mL) e 19,8 mL do tampão de digestão (1:20) foram preparados e misturados. Para a detecção da atividade enzimática, o sobrenadante dos biofilmes foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos a fim de ter qualquer micro-organismo

precitado. Em seguida, uma amostra de 100 µL de cada sobrenadante foi pipetada, em triplicata, em orifícios de uma placa de 96 poços específica para testes de fluorescência. Imediatamente após a pipetagem dos sobrenadantes, 100 µL da solução de trabalho caseína "*BODIPY*" foram adicionados sobre cada poço. Em seguida, a placa de 96 poços foi incubada por duas horas na temperatura ambiente e protegida de luz. Após o período de incubação, a leitura da fluorescência foi realizada em um leitor de micro placas com excitação em 485 nm e emissão em 538 nm. Os valores de fluorescência foram utilizados em equações lineares derivadas de curvas padrão concomitantemente confeccionadas sob as mesmas condições experimentais de acordo com as recomendações do fabricante. Desta forma, a atividade enzimática foi expressa em µg/mL.

Figura 9 - Kit "*EnzChek*" para quantificação de proteinase nos biofilmes simples e mistos.

Para o teste de fosfolipase, os biofilmes maduros (48 horas), simples e mistos, foram ressuspendidos em tampão de lise (2 M Tris-HCI, 1 M $CaCl_2$, água ultra-pura, pH 7,4), sonicados por 20 segundos para a disrupção e centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm. Para avaliar a atividade enzimática através da quantificação da fosfolipase, o kit fluorimétrico "*Amplex Red® phosphatidylcholine-specific phospholipase C assay*" foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 10). Brevemente, a solução de trabalho foi

preparada misturando 200 µL da solução estoque do reagente "*Amplex Red*" (20 mM), 100 µL da solução de estoque de "*Horseradish Peroxidase*", 200 µL da solução de estoque de "*Alkaline Phosphatase*", 100 µL da solução de estoque de "*Choline Oxidase*" e 78 µL da solução de lecitina em 9,32 mL do tampão de digestão (1:5). Em seguida, 100 µL dessa solução de trabalho preparada foram pipetados, em triplicata, em orifícios de uma placa de 96 poços específica para testes de fluorescência. Imediatamente após a pipetagem da solução de trabalho, 100 µL do lisado de cada condição experimental foram adicionados aos poços. Após a pipetagem da solução de trabalho e do lisado de cada condição experimental, a placa de 96 poços foi incubada por três horas a 37°C e protegida de luz. Após o período de incubação, a leitura da fluorescência foi realizada em um leitor de microplacas com excitação em 544 nm e emissão em 590 nm. Em seguida, os valores de fluorescência (nm) encontrados no teste foram utilizados para comparação com os valores de fluorescência dos controles positivos fornecidos pelo fabricante [fosfolipase purificada do *Bacillus cereus* e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)].

Os testes de proteinase e fosfolipase foram realizados em três ocasiões distintas com quatro amostras em triplicata para cada condição experimental.

Figura 10 - Kit "*Amplex Red*" para quantificação de fosfolipase C nos biofilmes simples e mistos.

4. 4. 5 Microscopia eletrônica de varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a relação entre os micro-organismos *C. albicans* e MSSA/MRSA. Para este teste, biofilmes simples e mistos foram formados e avaliados sobre cupons obtidos do fundo de placas de 24 poços (Figura 11).

Figura 11 - Cupons obtidos do fundo de placas de 24 poços utilizados para MEV.

Antes da utilização, os cupons foram esterilizados por meio de micro-ondas (650 W por 3 minutos)[7]. Em seguida, os biofilmes simples e mistos foram formados seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita para placas de 24 poços. Após 90 minutos, 12, 24 e 48 horas de incubação para formação dos biofilmes, o meio foi aspirado e as células não aderidas removidas por dupla lavagem com 1,5 mL de PBS estéril. Em seguida, as amostras foram fixadas com paraformaldeido 4% por 1 hora na temperatura ambiente e, então, desidratadas com sucessões de álcoois 70%, 85% e 100% durante 5 minutos por concentração. Os cupons permaneceram em temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora) para a total evaporação do último álcool e, dessa forma, garantir amostras livres de umidade.

Em seguida, os cupons foram montados em "*stubs*" de alumínio, revestidos por pulverização catódica com ouro e observados em microscópio Hitachi - Tablelap Scanning Electron Microscope TM-3000.

4. 4. 6 Colonização e invasão do epitélio oral humano reconstituído

Com o objetivo de mimetizar as condições reais da cavidade oral, culturas simples e mistas de *C. albicans*, MSSA e MRSA foram utilizadas para infectar o Epitélio Oral Humano Reconstituído (EOHR) comercializado pela ShinEthic Laboratories. Esse epitélio é obtido através de queratinócitos humanos derivados de carcinoma epidermóide da mucosa bucal, linha celular TR 146. A capacidade de colonização e invasão foi avaliada após 24 horas de infecção por microscopia de fluorescência. Inserções do tecido (0,5 cm^2) foram colocadas em placa de cultura de 24 poços, de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 12). Para a infecção dos tecidos, as suspensões dos três micro-organismos foram ressuspendidas em meio de manutenção, fornecido pelo fabricante dos tecidos, e padronizadas como descrito anteriormente. Após a padronização, os tecidos foram infectados com 500 µL do meio de manutenção dos tecidos e 500 µL da suspensão de cada micro-organismo (10^7 células/mL) para infecções simples. Para as infecções mistas, 500 µL da suspensão de cada micro-organismo foram utilizadas nas seguintes associações: *C. albicans* + MSSA e *C. albicans* + MRSA. Como controle negativo, 1 mL de meio de manutenção foi adicionado diretamente sobre a inserção do tecido. Em seguida, os controles e tecidos infectados foram incubados a 37°C em uma estufa com 5% de CO_2 com umidade saturada por 24 horas[8,80]. Além disso, biofilmes simples e mistos utilizados como controle foram formados utilizando o mesmo meio das culturas do tecido e as mesmas condições de incubação, mas na ausência do tecido. Após incubação, o sobrenadante de cada condição experimental foi coletado e armazenado para o teste da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e os tecidos foram

cuidadosamente lavados com 1 mL de PBS estéril. Para cada condição experimental (infecções simples de *C. albicans*, MSSA e MRSA e infecções mistas de Ca + MSSA e Ca + MRSA), dois tecidos foram infectados. Um dos tecidos foi dividido ao meio para análises de fluorescência e quantificação do número de micro-organismos através de RT-qPCR e o outro tecido infectado foi utilizado para extração de RNA e posterior análise da expressão gênica.

Figura 12 - Inserções do EOHR colocadas sobre placas de 24 poços para infecção com biofilmes simples e mistos.

4. 4. 7 Microscopia de fluorescência

Técnicas histológicas

Os tecidos infectados foram fixados em paraformaldeído 4% (v/v em água ultra pura) durante 24 horas a 4ºC. Em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina através de técnicas básicas de histologia. Os tecidos foram seccionados (20 μm) em micrômetro e colocados em lâminas Histobond+. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em solução de xileno, etanol e, finalmente, em água. As secções preparadas foram coradas com sondas universais de DNA através da metodologia de PNA-FISH[8,80].

Hibridização "*in situ*" (PNA-FISH – "*Peptide nucleic acid - fluorescent in situ hybridization*")

Para avaliar a colonização e invasão do EOHR pelas infecções simples e mistas, sondas de DNA espécies-específicas foram sintetizadas. A técnica de hibridização "*in situ*" foi empregada utilizando Alexa Fluor 594-labelled PNA (OO-AGA GAG CAG CAT GCA) para marcação de *C. albicans* (excitação de 546 nm e emissão de 600-660 nm), Alexa Fluor 488-labelled PNA (OO- TGC CTC CCG TAG GAG) para marcação das bactérias (excitação de 565 nm e emissão de 580 nm) e ambas as sondas (1:1) para marcação das infecções mistas. Em seguida, as lâminas foram protegidas da luz e incubadas em estufa a 55ºC por 90 minutos dentro de uma câmara úmida. Após hibridização, o excesso das sondas foi removido através da imersão das lâminas em solução de lavagem (1 M Tris-HCl, 1 M EDTA e água ultra pura) pré aquecida (55ºC) durante 30 minutos. Para marcação do núcleo dos queratinócitos foi utilizado "*Hoechst 33258 dye*" (1 μg/mL) por 10 minutos na temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com solução de lavagem para a remoção do excesso de "*Hoechst*". Em seguida, os tecidos foram montados em meio de montagem e observados em microscópio de fluorescência equipado com câmera (DP71; Olympus Portugal SA, Porto, Portugal) e filtros capazes de detectar o comprimento de fluorescência das sondas e do "*Hoechst*" (excitação de 485 nm e emissão de 410–485 nn)[8]. *C. albicans* e bactérias foram identificadas por coloração vermelha e verde, respectivamente, enquanto os queratinócitos foram pigmentados em azul.

É importante ressaltar que, previamente à hibridização com as sondas, as lâminas foram tratadas com 50 μL de solução de lisozima (10 mg/mL) a 37ºC durante 2 horas. A utilização prévia de lisozima foi necessária para degradação da parede celular das bactérias uma vez que bactérias Gram+ apresentam grande quantidade de peptidoglicanos, os quais dificultam a completa penetração das sondas de DNA.

4. 4. 8 Liberação da enzima Lactato desidrogenase

A liberação da enzima LDH para o sobrenadante dos tecidos infectados foi mensurada para avaliar o dano causado pelos micro-organismos ao tecido, uma vez que esta enzima citosólica é liberada quando a integridade da membrana é afetada. A concentração da enzima LDH foi determinada após 24 horas de infecção, utilizando o kit "*CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay*", de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 13). Brevemente, o reagente "*CytoTox-ONE™*" foi preparado adicionando 11 mL do "*Assay Buffer*" no frasco "*Substrate Mix*" a 22°C. Em seguida, 100 µL de cada amostra experimental e controles foram adicionados, em triplicata, em placa de 96 poços específica para testes de fluorescência. Imediatamente após a pipetagem das amostras, 100 µL do reagente "*CytoTox-ONE™*" foram adicionados e a placa foi incubada em estufa a 22°C por 10 minutos. Após incubação, 50 µL da solução de "*stop*" foram adicionados sobre cada poço e, então, a fluorescência foi mensurada utilizando um leitor de fluorescência com excitação de 560 nm e emissão de 590 nm, de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle, os valores de LDH determinados em preparações com os mesmos micro-organismos crescidos nas mesmas condições, mas na ausência de tecido, foram subtraídos dos valores de LDH determinados nos tecidos infectados em cada condição experimental[8]. A quantidade de LDH liberada durante as infecções simples e mistas foi expressa em relação ao controle dos tecidos não infectados (valores de fluorescência do tecido na presença de meio subtraídos dos valores de fluorescência do meio na ausência do tecido), de acordo com a fórmula abaixo:

$$LDH = \frac{(\text{Micro-organismos+Tecido+Meio}) - (\text{Micro-organismos+Meio})}{(\text{Tecido+Meio}) - (\text{Meio})}$$

Figura 13 - Kit "*CytoTox-One*" utilizado para quantificar a enzima LDH liberada após infecção dos tecidos.

4. 4. 9 Quantificação dos micro-organismos no EOHR

Extração de DNA

Para extração do DNA, os tecidos infectados foram colocados em tubos "*eppendorfs*" estéreis contendo aproximadamente 300 µL de esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro) e 600 µL de tampão sorbitol (GRISP). Então, os "*eppendorfs*" foram homogeneizados 3 vezes por 60 segundos utilizando um "*Mini-Beadbeater-8*" e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo estéril. Em seguida, foi realizada a extração do DNA utilizando o kit "*GRS Genomic DNA Kit*" – Tissue (Figura 14), de acordo com as recomendações do fabricante. Após extração, o DNA de cada condição experimental foi quantificado utilizando espectrofotômetro (NanoDrop 1000 Spectrophotometer).

Figura 14 - Kit "*GRS Genomic DNA Kit – Tissue*" (GRISP) utilizado para extração de DNA.

Quantificação de células fúngicas e bacterianas por RT-qPCR

O número de micro-organismos colonizando o tecido foi quantificado utilizando RT-qPCR (Figura 15).

Figura 15 - Imagem ilustrativa do "*Step One Plus*", utilizado na leitura de RT-qPCR.

Para cada condição experimental, 4 µL do DNA extraído foram adicionados a 16 µL de uma solução "*Master Mix*" [10 µL do fluoróforo ("*SsoFast EvaGreen Supermix*"), 0,2

µL de cada primer a 50 mM (Quadro 1) e 5,6 µL de água livre de RNAases], resultando em um volume final de 20 µL. Controles negativos foram preparados utilizando água livre de RNAases em substituição às amostras de DNA. Moldes de DNA para cada controle positivo foram obtidos a partir de tecidos e das culturas planctônicas de cada estirpe microbiana, através do passo de extração de DNA anteriormente descrito. Os ciclos do PCR consistiram de um passo inicial de desnaturação a 94ºC por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de desnatuaração a 94°C for 15 segundos, "*annealing*" dos primers a 60ºC por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Em cada ciclo, um estágio de dissociação a 60°C foi executado para gerar a curva de "Melt" para verificação da especificidade do produto amplificado[8]. Para cada condição experimental, curvas de calibração foram construídas utilizando-se o mesmo protocolo descrito acima. Para a construção destas curvas, diluições seriadas de concentrações conhecidas de cada condição experimental foram preparadas e a extração de DNA dessas culturas planctônicas foi realizada utilizando o kit "*GRS Genomic DNA Kit – Tissue*", de acordo com as recomendações do fabricante.

Quadro 1 - Sequência "*Forward*" (FW) e "*Reverse*" (RV) dos primers utilizados para o qPCR

Gene	Espécies	Sequência (5' → 3')	Primer	Referência ou fonte
ALS3	*C. albicans*	CTGGACCACCAGGAAACACT	FW	Alves et al. 2014
		GGTGGAGCGGTGACAGTAGT	RV	
HWP1	*C. albicans*	TCTACTGCTCCAGCCACTGA	FW	Alves et al. 2014
		CCAGCAGGAATTGTTTCCAT	RV	
*ACT**	*C. albicans*	TGCTGAACGTATGCAAAAGG	FW	Alves et al. 2014
		TGAACAATGGATGGACCAGA	RV	
clfA	MSSA, MRSA	CTCTCATTCTAGGCGCAC	FW	Stutz et al. 2011
		AGAAACGCCGGTAACT	RV	
clfB	MSSA, MRSA	GCGCATTGGAAATCGT	FW	Stutz et al. 2011
		AGAGCCAGCTTCAACA	RV	
pl-C	MSSA, MRSA	AGATTCGTTGAGTAAAAGTCCAGA	FW	Este estudo
		AGTGAATGAGCCACTATCATGTGA	RV	
ssP	MSSA, MRSA	ACGACACCTTTGCCGAATGT	FW	Este estudo
		CCATCTTAGTAGATGAAGGTTCAGC	RV	
*16S rRNA**	MSSA, MRSA	TGTCGTGAGATGTTGGG	FW	Stutz et al. 2011
		CGATTCCAGCTTCATGT	RV	

***** genes de controle interno ("*housekeeping gene*").

4. 4. 10 Análise da expressão de genes de virulência

Seis genes de virulência [*ALS3, HWP1* (para *C. albicans*); *clfA, clfB, ssP* e *pl-C* (para MSSA/MRSA)] foram analisados em infecções simples e mistas e em superfícies biótica (EOHR) e abiótica (placa de poliestireno). Os genes *ACT1* e *16S-RNA* foram utilizados como genes de referência ("*housekeeping gene*") para *C. albicans* e MSSA/MRSA, respectivamente.

Extração de RNA

Para a extração do RNA, o kit "*RNeasy Mini*" (Figura 16) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Figura 16 - Kit "*RNeasy Mini*" utilizado para extração de RNA.

Brevemente, um tampão de lise foi preparado adicionando 10 µL de β-mercaptoetanol por mL de tampão RLT (Qiagen). Em seguida, os tecidos foram adicionados a tubos "*eppendorfs*" contendo aproximadamente 300 µL de esferas de vidro (0,5 mm diâmetro) e 600 µL do tampão de lise. O lisado foi homogeneizado utilizando um "*Mini-Bead-Beater-8*" durante 60 segundos por 3 vezes consecutivas, para completa disrupção do tecidos. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e armazenado em outro "*eppendorf*" para que etanol 70% fosse adicionado sobre esse lisado e misturado através de pipetagem (nesse momento não deve haver centrifugação). Essa mistura (700 µL) foi transferida para uma coluna posicionada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugada por 15 segundos a 8000 x g. Após centrifugação, o fluido foi descartado e 700 µL do tampão RW1 foram adicionados sobre à coluna e centrifugados por 15 segundos a 8000 x g. Após o fluido ter sido descartado, 500 µL do tampão RPE foram adicionados à coluna e centrifugados a 8000 x g por 15 segundos. Novamente, o fluido foi descartado, 500 µL do tampão RPE foram adicionados sobre à coluna e a solução foi centrifugada a 8000 x g por 2 minutos. Finalmente, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL e 50 µL de água livre de RNase

foi adicionado diretamente sobre a coluna e centrigugado por 8000 x g durante 1 minuto para eluir o RNA. O RNA das células na ausência do EOHR preparadas e cultivadas da mesma maneira que as células destinadas a infecção do tecido também foi extraído seguindo o mesmo protocolo. A quantidade e a qualidade das amostras de RNA foram determinadas por densidade óptica (OD - 260/280) em espectrofotômetro (NanoDrop 1000 Spectrophotometer). O RNA extraído foi armazenado a -80^{o}C até o momento de sua utilização na síntese de DNA complementar (cDNA).

Design e confirmação da eficiência dos primers

Os primers foram obtidos de acordo com a sequência individual de cada gene selecionado. Foram utilizados também genes endógenos "*housekeeping genes*" como controle para a normalização. Além disso, foram feitas curvas padrão do gene de referência e dos genes alvos selecionados de cada espécie para verificação da eficiência dos primers, análise do coeficiente de regressão, especificidade de amplificação verificada pela curva de "Melt" (um único pico de dissociação na curva de desnaturação demonstrou a presença de um único produto na mistura da reação), bem como determinação da faixa de concentração da amostra que melhor se amplificou (pura ou diluída). Para validar a especificidade de cada par de primers, para cada gene selecionado, o DNA genômico de cada micro-organismo foi amplificado através da técnica de RT-qPCR.

Síntese de DNA complementar

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o "*Kit High Capacity cDNA*", kit hexâmero para eucariotos e procariotos, conforme protocolo recomendado pelo fabricante (Figura 17).

Figura 17 – "*Kit High Capacity cDNA*" utilizado para síntese de cDNA.

As concentrações de RNA de todas as amostras foram ajustadas para 15 ng/µL para biofilmes em superfície abiótica e 50 ng/µL para tecidos infectados. A concentração de RNA foi 3,33 vezes maior para a formação de biofilmes em superfície biótica, uma vez que esta continha RNA dos micro-organismos e do tecido. Para isto, 10 µL do RNA extraído de cada condição experimental foram adicionados à 10 µL de uma "*Master mix*" (2 µL de 10X "*RT buffer*", 0,8 µL de dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT "*random hexamer primers*", 1 µL de "*MultiScribe^{TM} reverse transcriptase*" e 4,2 µL de água livre de RNase), perfazendo um volume final de 20 µL. A síntese de cDNA foi realizada a 25°C por 10 minutos e, em seguida, a 37°C por 2 horas. Após este período, a enzima foi inativada a 85°C por 5 segundos. As amostras de cDNA foram diluídas na proporção de 1:20 e 1:10 para amostras do tecido e amostras da placa, respectivamente, e armazenadas a -20°C até o momento em que foram submetidas ao RT-qPCR.

RT-qPCR

Os produtos da transcrição reversa foram amplificados para quantificar a expressão relativa dos genes selecionados. Para isto, foi utilizado o fluoróforo "*SsoFast EvaGreen Supermix*" que, quando intercalado à dupla fita de DNA, emite fluorescência sob

excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR, permitiu o monitoramento da quantidade crescente de cDNA amplificado. A reação foi efetuada em placas de PCR da seguinte maneira: 16 µL da "*Master mix*" [10 µL de "*EvaGreen*", 0,6 µL de "*primer forward*" (10 mM), 0,6 µL de "*primer reverse*" (10 mM) e 4,8 µL de água livre de RNase] e 4 µL de cDNA de cada condição experimental, perfazendo um volume final de 20 µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado e agitada por um minuto em vórtex próprio. A reação de RT-qPCR foi realizada com um passo inicial de desnaturação a 94ºC por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, "*annealing*" dos primers a 60ºC por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Em cada ciclo, um estágio de dissociação a 60°C foi executado para gerar a curva de "Melt" para verificação da especificidade do produto amplificado[8]. Controles negativos foram incluídos em todas as placas com reações contendo 4µL de água livre de RNase substituindo o cDNA. Os genes *ACT1* e *16S-RNA* foram utilizados como genes normalizadores de *C. albicans* e das bactérias, respectivamente. Os resultados foram analisados com base no valor de CT ("*cicle threshold*" - ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do alvo avaliado. As médias dos valores de CT foram utilizadas para calcular a expressão relativa dos genes de interesse utilizando os genes endógenos selecionados para normalização. O nível de expressão dos genes de normalização foram constantes em todos os ensaios.

4. 5 Metodologia estatística

No presente estudos, as seguintes variáveis de interesse foram consideradas para análise:

- ✓ número de colônias viáveis (UFC/mL)
- ✓ absorbância da atividade metabólica (Abs XTT)
- ✓ absorbância da biomassa total (Abs CV)
- ✓ produção de proteinase (SAP) em µg/mL
- ✓ produção de fosfolipase C (PL-C) em nm
- ✓ liberação de LDH em nm
- ✓ expressão gênica de *ALS3*, *HWP1*, *clfA*, *clfB*, *ssP* e *pl-C*

De forma geral, neste estudo, dois fatores de variação puderam ser considerados nas análises:

1. período de tempo (90 minutos, 12, 24 e 48 horas para os ensaios de quantificação por meio de UFC/mL e XTT e 12, 24 e 48 horas para o ensaio de CV)
2. condição de crescimento (culturas simples de *C. albicans*, MSSA e MRSA e culturas mistas de *C. albicans* + MSSA, e *C. albicans* + MRSA)

É importante ressaltar que, para a análise, os resultados referentes à contagem de colônias viáveis foram previamente transformados em logaritmo na base 10 ($\log_{10}$ UFC/mL) a fim de atingir uma distribuição normal dos dados. Considerando que os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram atingidos, uma análise paramétrica foi realizada utilizando ANOVA fatorial para avaliar os possíveis efeitos da interação entre "período de tempo" e "condições de crescimento". Para a análise dos dados de $\log_{10}$ de UFC/mL, ANOVA fatorial 4 x 3 e 4 x 4 foram utilizadas para *C. albicans* e bactérias, respectivamente.

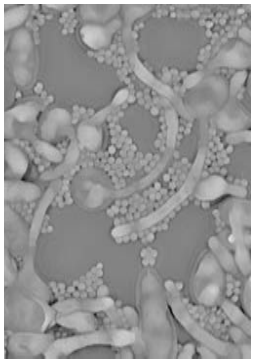
Para a análise de Abs XTT e Abs CV, foram utilizadas ANOVA fatorial 4 x 5 e 3 x 5, respectivamente. Quando a interação foi significativa ($\rho<0,05$), ambos os fatores foram analisados separadamente por meio de ANOVA a um critério e teste "*post-hoc*" de Tukey. Quando a interação não foi significativa, apenas os resultados do fator significativo foram analisados separadamente.

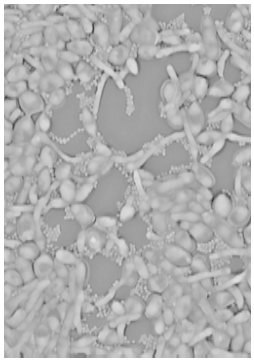
Para as atividades de SAP e PL-C, apenas o fator "condição de crescimento" foi considerado na análise, a qual foi realizada utilizando ANOVA a um critério ou ANOVA com correção de Welch em casos heterocedásticos, seguidas pelo teste "*post-hoc*" de Tukey e Games-Howell, respectivamente.

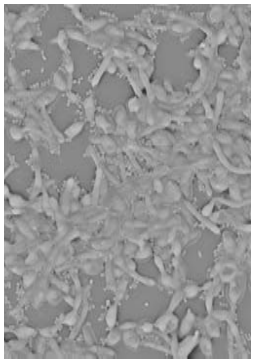
Na análise dos resultados referentes aos testes de quantificação da liberação de LDH e moleculares, o fator considerado foi "condição de crescimento". Os resultados referentes à liberação de LDH foram analisados utilizando ANOVA a um critério, seguido pelo teste "*post-hoc*" de Tukey.

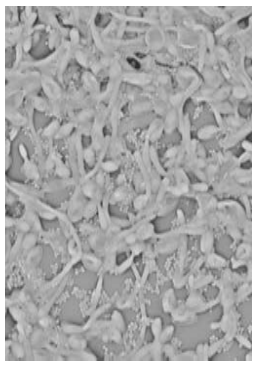
Os resultados da expressão gênica de infecções/biofilmes simples foram comparados exclusivamente com suas infecções/biofilmes mistos (*C. albicans* com *C. albicans* + MSSA e *C. albicans* + MRSA; MSSA com *C. albicans* + MSSA e MRSA com *C. albicans* + MRSA). Quando os resultados assumiram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, foi utilizado ANOVA a um critério. ANOVA com correção de Welch foi aplicada em casos heterocedásticos. Para comparações múltiplas, testes "*post-hoc*" de Tukey ou Games-Howell foram aplicados.

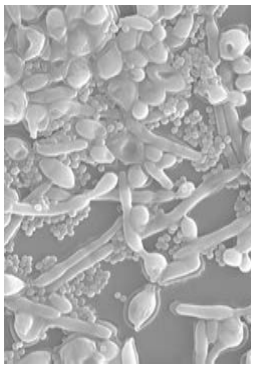
Todos os testes do presente estudo foram realizados utilizando o programa estatístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) a um nível de significância de 95%.











Resultado

5 Resultado

Interação entre os micro-organismos na fase de adesão e formação de biofilme com relação aos fatores de virulência avaliados

Na Tabela 1 abaixo, estão apresentados os valores do teste ANOVA fatorial para todos os fatores de virulência avaliados nos micro-organismos em fase de adesão e formação de biofilme.

Tabela 1 - ANOVAs fatoriais dos valores médios de $\log_{10}$ UFC/mL, Abs CV, Abs XTT, atividade de SAP e PL-C para *C. albicans* e bactérias

			GL†	F-value	ρ-value
$\log_{10}$UFC/mL	***C. albicans***	**Período de tempo**	3	56,5166	<0,0001*
		Condição de crescimento	2	0,7846	0,5381
		Interação	6	1,5518	0,1635
	Bactérias	**Período de tempo**	3	337,5055	<0,0001*
		Condição de crescimento	3	15,1278	<0,0001*
		Interação	9	4,1278	0,0002*
Abs CV		**Período de tempo**	2	44,7022	<0,0001*
		Condição de crescimento	4	206,437	<0,0001*
		Interação	8	3,7525	0,0006*
Abs XTT		**Período de tempo**	3	268,3263	<0,0001*
		Condição de crescimento	4	187,3755	<0,0001*
		Interação	12	21,2554	<0,0001*
Atividade SAP		**Condição de crescimento**	3	326,653	<0,0001*
Atividade PL-C		**Condição de crescimento**	6	82,697	<0,0001*

†GL: Graus de Liberdade

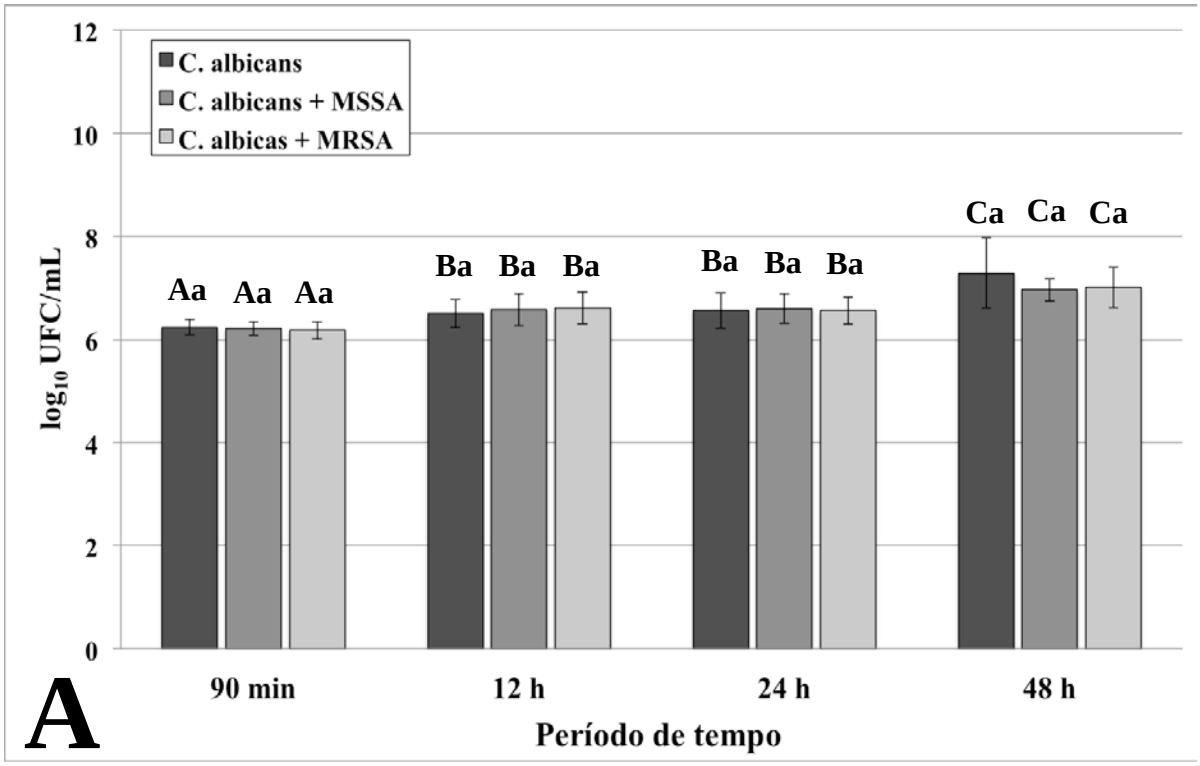
*Diferenças significativas em ρ<0,05

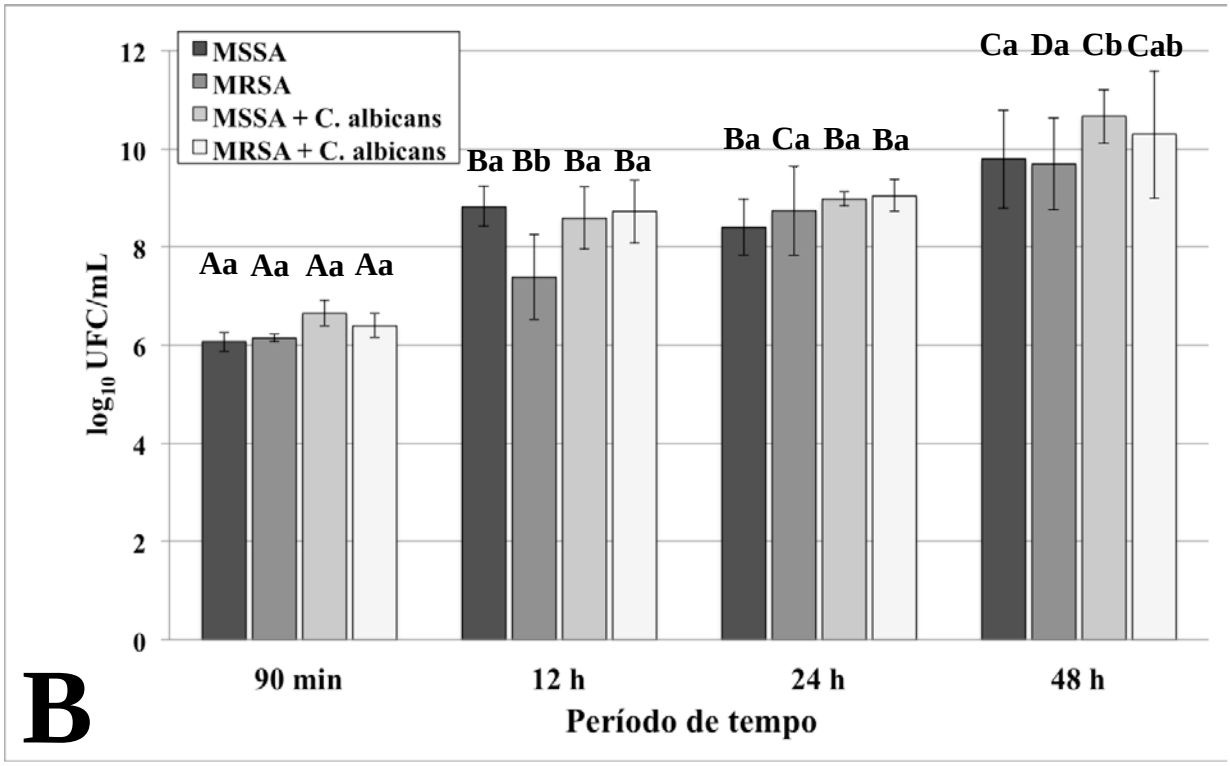
Quantificação de células aderidas e biofilme formado (UFC/mL)

C. albicans, MSSA e MRSA foram capazes de aderir (90 minutos) e formar biofilme tanto em culturas simples quanto em mistas. De acordo com a Tabela 1, é possível observar que, enquanto não houve influência das condições de crescimento sobre o número de células de *C. albicans*, o fator "período de tempo" influenciou significativamente ($\rho<0,0001$) os valores de $\log_{10}$ UFC/mL deste micro-organismo, no entanto, não houve interação significativa entre os fatores avaliados. Pela Figura 18A, é possível observar um pequeno aumento, porém gradual, nos valores de $\log_{10}$ UFC/mL ao longo do tempo. Após 48 horas, o número de células em todas as condições de crescimento avaliadas foi significativamente maior quando comparado aos demais períodos de tempo ($\rho<0,05$). Também é possível notar que os valores de $\log_{10}$ UFC/mL de *C. albicans* permanecem invariáveis na presença das bactérias quando comparado aos biofilmes simples de *C. albicans*.

Para as bactérias, ambos os fatores analisados apresentaram efeitos significativos ($\rho<0,0001$) sobre os valores de $\log_{10}$ UFC/mL (Tabela 1), e além disso, também houve interação significativa entre os fatores avaliados. Independentemente se as bactérias foram cultivadas em biofilmes simples ou mistos, os valores de $\log_{10}$ UFC/mL apresentaram aumento gradual ao longo do tempo (Figura 18B), atingindo um pico de crescimento às 48 horas ($\rho<0,05$). Também é possível observar que, em 48 horas, o número de células de MSSA aumentou significativamente ($\rho<0,05$) quando cultivadas na presença de *C. albicans* (Figura 18B).

Figura 18 - Valores das médias de $\log_{10}$ UFC/mL para crescimentos simples e mistos de *C. albicans* (A), MSSA e MRSA (B), em RPMI a 37ºC. Barras de erro representam os desvios-padrão. Letras maiúsculas mostram diferenças entre período de tempo e letras minúsculas mostram diferenças entre condições de crescimento (teste "*post-hoc*" de Tukey; ρ>0,05).



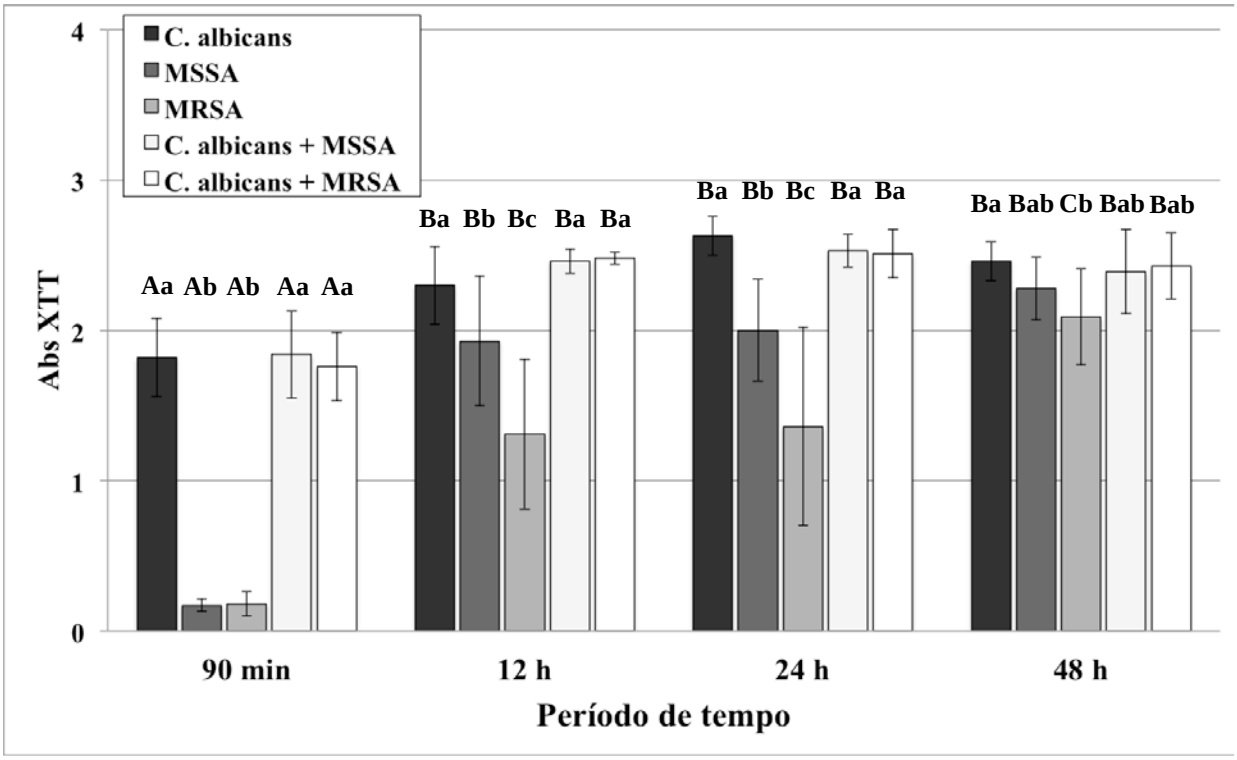


Quantificação de atividade metabólica (Abs XTT)

O teste ANOVA fatorial revelou efeitos significativos dos dois fatores avaliados (período de tempo e condição de crescimento) nos valores de Abs de XTT (Tabela 1). Todos os micro-organismos, em ambas as condições de crescimento, tiveram um aumento significativo ($\rho<0,05$) nos valores de atividade metabólica do período de adesão para o período de 12 horas de formação de biofilme (Figura 19). Após o período de 12 horas, nenhuma mudança foi observada, exceto para os biofilmes simples de MRSA, que apresentaram maior atividade metabólica no período de 48 horas.

Quando o fator "condição de crescimento" foi analisado, não foram observadas diferenças significativas ($\rho>0,05$) nos valores de atividade metabólica entre biofilmes simples de *C. albicans* e biofilmes mistos, desde a fase de adesão até a fase de formação de biofilme em 24 horas. Além disso, da fase de adesão até a formação de biofilme em 24 horas, também foi possível observar valores de Abs de XTT significativamente maiores ($\rho<0,05$) para os biofilmes simples de *C. albicans* e biofilmes mistos, quando comparado aos biofilmes simples das bactérias. Nos períodos de 12 e 24 horas, os biofilmes simples de MRSA apresentaram valores de atividade metabólica significativamente inferiores ($\rho<0,05$) quando comparados aos biofilmes simples de MSSA. Às 48 horas de formação de biofilme, não foram detectadas diferenças significativas ($\rho>0,05$) entre biofilmes simples e mistos, com exceção do biofilme simples de *C. albicans*, que apresentou maior atividade metabólica quando comparado ao biofilme simples de MRSA ($\rho<0,05$).

Figura 19 - Valores das médias de Abs de XTT para crescimentos simples e mistos de *C. albicans*, MSSA e MRSA, em RPMI a 37ºC. Barras de erro representam os desvios-padrão. Letras maiúsculas mostram diferenças entre período de tempo e letras minúsculas mostram diferenças entre condições de crescimento (teste "*post-hoc*" de Tukey; ρ>0,05).

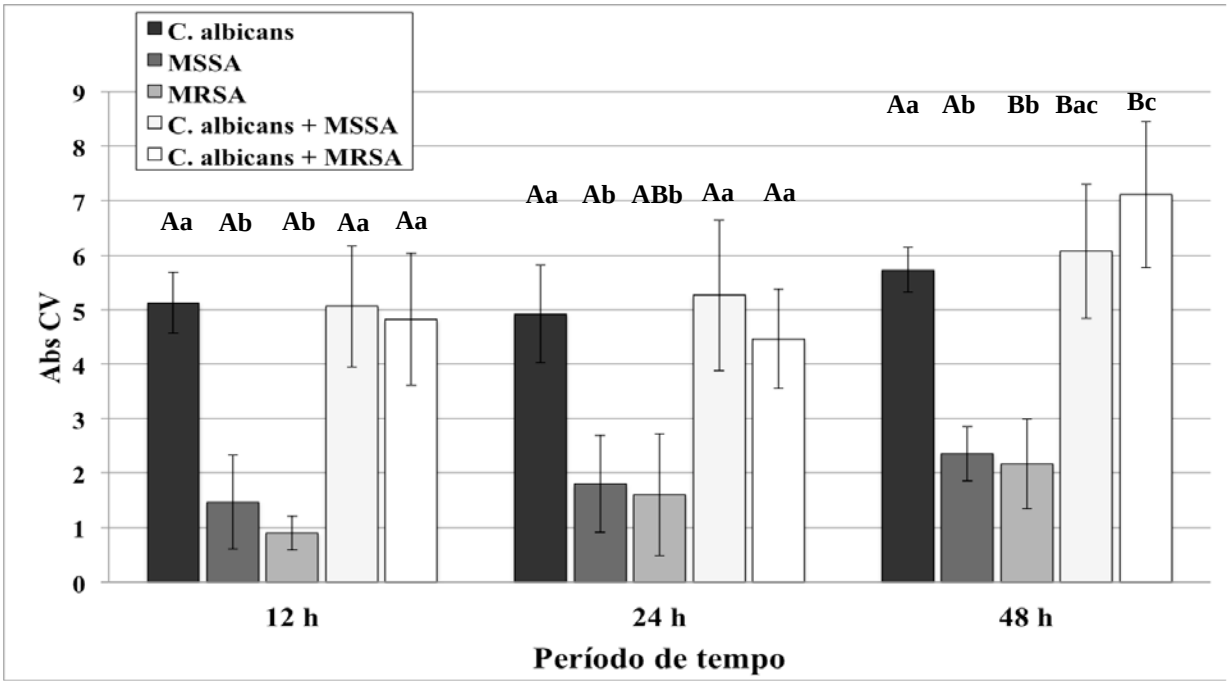


Quantificação de biomassa total (Abs CV)

O teste ANOVA fatorial revelou efeitos significativos de ambos os fatores "período de tempo" e "condição de crescimento" nos valores de Abs do CV (Tabela 1). A Figura 20 reúne os resultados de biomassa total dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans*, MSSA e MRSA. De maneira geral, os biofilmes simples de *C. albicans* e biofilmes mistos apresentaram valores de biomassa total significativamente mais elevados (ρ<0,05) quando comparado àqueles dos biofilmes simples das bactérias. Em todas as condições de crescimento, nenhuma mudança nos valores de biomassa total foi observada de 12 horas para 24 horas (ρ>0,05), com exceção dos biofilmes simples de MRSA que apresentaram aumento significativo de biomassa às 24 horas. Embora ambos os biofilmes mistos tiveram a biomassa total aumentada de 24 horas para 48 horas (ρ<0,05), nenhuma diferença significativa foi

observada para os biofilmes simples de *C. albicans* e bactérias.

Figura 20 - Valores das médias de Abs de CV para crescimentos simples e mistos de *C. albicans*, MSSA e MRSA, em RPMI a 37ºC. Barras de erro representam os desvios-padrão. Letras maiúsculas mostram diferenças entre período de tempo e letras minúsculas mostram diferenças entre condições de crescimento (teste "*post-hoc*" de Tukey; ρ>0,05).



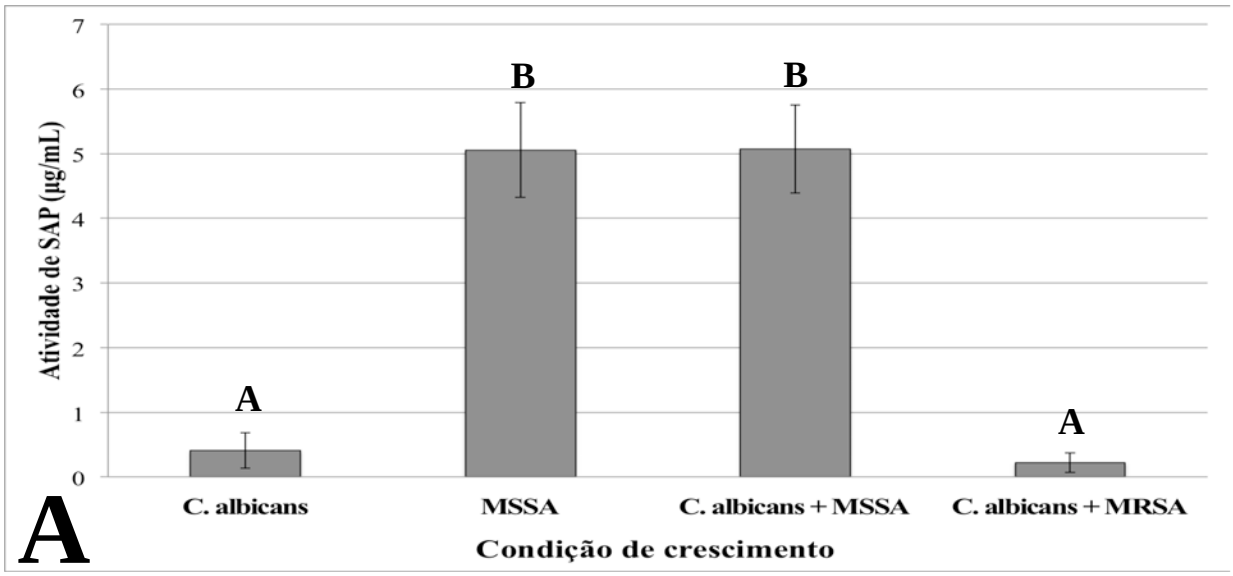
Quantificação de enzimas degradativas específicas

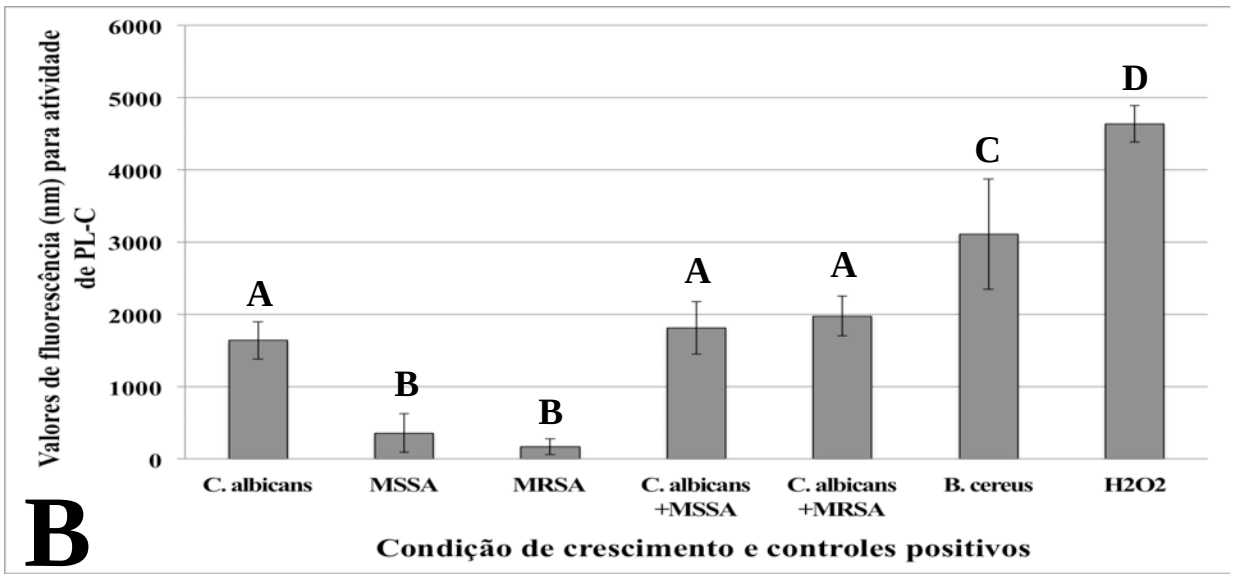
O teste ANOVA a um critério com correção de Welch revelou efeitos significativos do fator "condição de crescimento" nas atividades de proteinase (SAP) e fosfolipase (PL-C) (Tabela 1). Para a atividade de SAP, os biofilmes simples de *C. albicans* e os biofilmes mistos de *C. albicans* + MRSA produziram quantidades significativamente menores (ρ<0,001) de SAP quando comparado aos biofilmes simples de MSSA e biofilme misto de *C. albicans* + MSSA (Figura 21A). A atividade enzimática dos biofilmes simples de MRSA não foi detectada pelo teste fluorimétrico utilizado.

Os valores de fluorescência de PL-C estão apresentados na Figura 21B. Biofilmes simples de *C. albicans* e biofilmes mistos apresentaram valores de fluorescência

significativamente maiores (ρ<0,05) quando comparado aos biofilmes simples das bactérias. Ambos os controles positivos mostraram valores de fluorescência mais altos (ρ<0,05) do que os valores apresentados por *C. albicans*, MSSA e MRSA em todas as condições de crescimento.

Figura 21 - Atividade de SAP (A) e PL-C (B) de biofilmes simples e mistos de *C. albicans*, MSSA e MRSA crescidos em RPMI a 37ºC e controles positivos. Barras de erro representam os desvios-padrão. Letras maiúsculas mostram diferenças entre as condições de crescimento (teste "*post-hoc*" de Games-Howell; ρ>0,05).

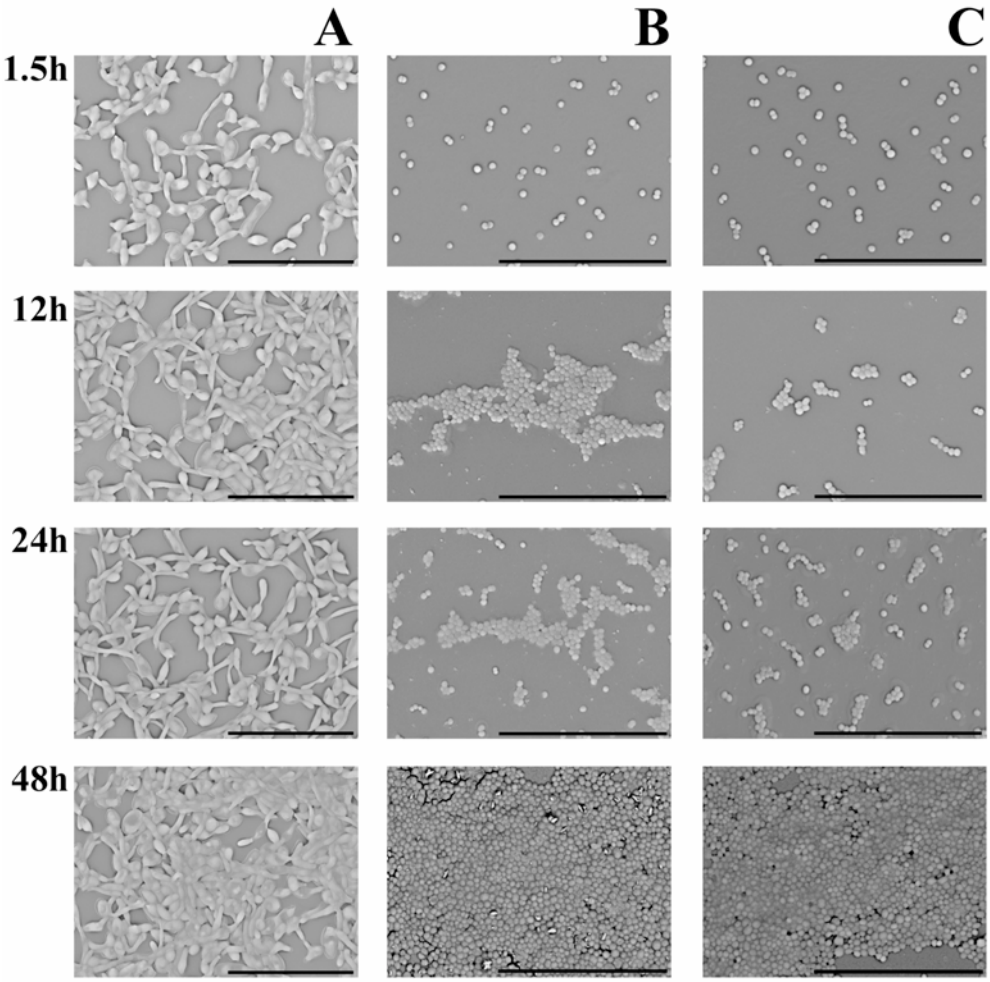




Microscopia Eletrônica de Varredura

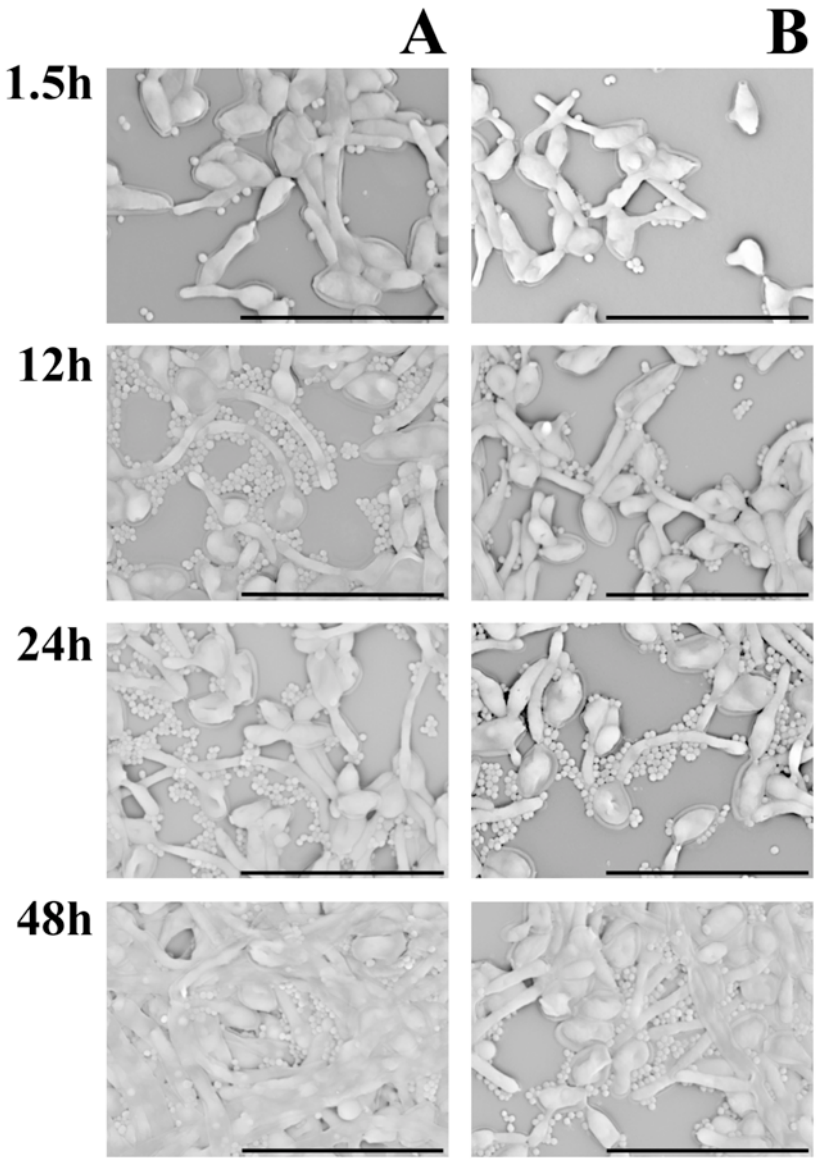
Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para examinar adesão e formação de biofilme em termos de estrutura e interação entre células fúngicas e bacterianas (Figura 22). Na fase de adesão, culturas simples de *C. albicans* revelaram uma camada não contígua de células. No entanto, nesta fase, é possível observar a formação inicial de hifas (Figura 22A). Nas fases subsequentes de biofilmes, também foi possível observar maior espessura e maior número de hifas, assim como células mais agregadas (12, 24 e 48 horas). É importante enfatizar que, após 48 horas de formação, o biofilme resultante apresenta-se mais robusto e ancorado à superfície (Figura 22A). A adesão e a evolução dos biofilmes simples de MSSA e MRSA estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 22B e 22C. Na fase inicial de adesão (90 minutos), ambas as cepas revelaram um grau semelhante de adesão, com menor quantidade de células uniformemente distribuídas. A estrutura do biofilme de ambas as cepas foi comparável às 48 horas, apesar dos biofilmes de MSSA apresentarem maior número de cocos intimamente agregados nos períodos anteriores (Figura 22B).

Figura 22 - Microscopia eletrônica de biofilmes simples de *C. albicans* (A), MSSA (B), MRSA (C) em RPMI a 37ºC. A barra nas imagens corresponde a 20 µm de *C. albicans* (ampliação de 2500x) e 20 µm para crescimento das bactérias (ampliação de 5000x).



A Figura 23 (A e B) corresponde a interação física entre biofilmes mistos de *C. albicans* + MSSA e *C. albicans* + MRSA, respectivamente. As imagens revelam uma extensa adesão de MSSA e MRSA à *C. albicans*, com uma associação preferencial aos elementos fúngicos invasivos (hifas) e menor adesão às formas fúngicas arredondadas (blastóporos). É possível observar uma maior interação das bactérias com as hifas de *C. albicans* após os 90 minutos. Além disso, é importante destacar que, em áreas de crescimento denso de hifas, células de MSSA e MRSA aparecem em maior quantidade quando comparado com a superfície dos poços.

Figura 23 - Microscopia eletrônica de biofilmes mistos de *C. albicans* + MSSA (A) e *C. albicans* + MRSA (B) crescidos em RPMI a 37ºC. A barra nas imagens corresponde a 20 µm para crescimentos mistos (ampliação de 5000x).



Infecções simples e mistas de C. albicans e S. aureus em EOHR

O padrão de colonização e invasão do EOHR por *C. albicans*, MSSA e MRSA foi examinado após 24 horas de incubação em infecções simples e mistas (Figuras 24 e 25 e Tabela 2). Os resultados mostraram que os três patógenos foram capazes de colonizar o tecido em infecções simples e mistas. Além disso, em infecções simples, *C. albicans* foi capaz de

invadir o tecido, com as hifas penetrando completamente todas as camadas do epitélio (Figura 24A). Por outro lado, a invasão do EOHR por infecções simples de ambas as estirpes bacterianas não foi aparente, com células bacterianas detectadas apenas na camada superficial dos queratinócitos (Figuras 24B e C).

Nas coinfecções, uma adesão extensa de MSSA e MRSA à *C. albicans* foi observada, com uma associação preferencial aos elementos invasivos (hifas) (Figura 25). Ao contrário das infecções simples, quando as bactérias foram coinfectadas com *C. albicans*, foi possível observar a invasão do EOHR pelas cepas de *S. aureus*. Dentro do tecido, as células bacterianas foram vistas em estreita proximidade com às hifas de *C. albicans* (Figuras 25A e B). Além disso, também foi possível observar um deslocamento superficial das camadas dos queratinócitos nas infecções mistas (Figura 25).

Figura 24 - EOHR infectado por culturas simples de *C. albicans* (A), MSSA (B) e MRSA (C) durante 24 horas utilizando microscopia de fluorescência com a técnica de hibridização "*in situ*" (PNA-FISH). *C. albicans* corada em vermelho, *S. aureus* em verde e queratinócitos em azul.

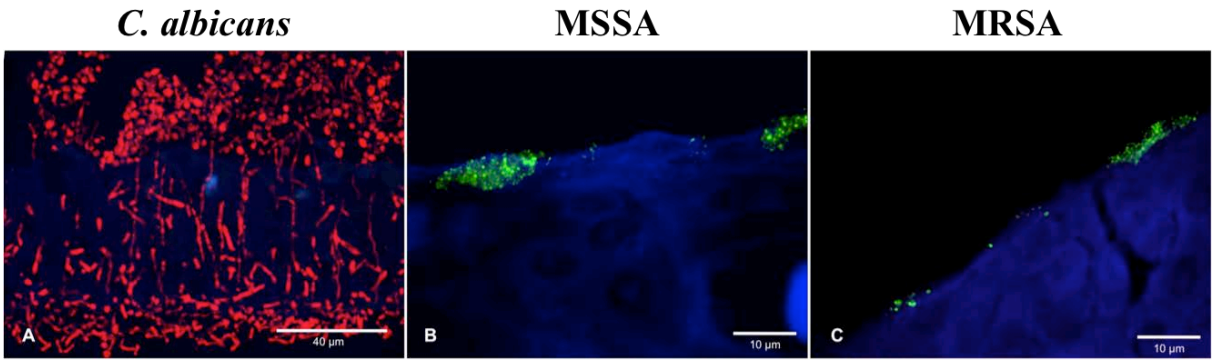
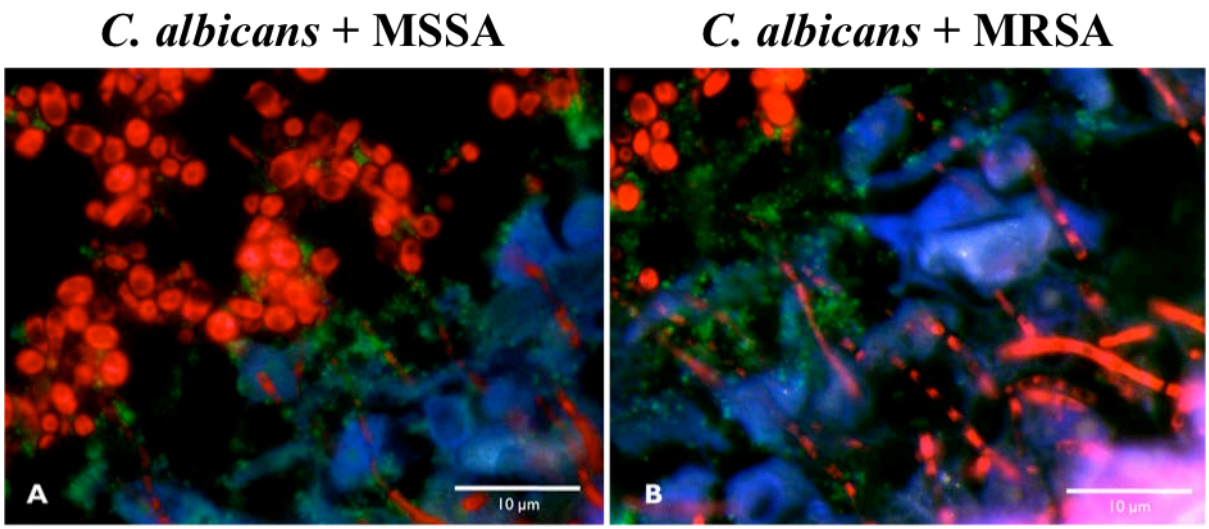


Figura 25 - EOHR infectado por culturas mistas de *C. albicans* + MSSA (A) e *C. albicans* + MRSSA (B) durante 24 horas utilizando microscopia de fluorescência com a técnica de hibridização "*in situ*" (PNA-FISH). *C. albicans* corada em vermelho, *S. aureus* em verde e queratinócitos em azul.



O número de micro-organismos presente nas secções do tecido, nas condições testadas, foi quantificado utilizando a técnica de RT-qPCR (Tabela 2). Em geral, o nível de colonização foi semelhante para todos os micro-organismos em infecções simples e mistas, exceto para MSSA, que mostrou uma diminuição de 1,49 log no número de células quando cocultivado com *C. albicans*.

Tabela 2 - Infecções simples e mistas de *C. albicans*, MSSA e MRSA em EOHR durante 24 horas utilizando microscopia de fluorescência com técnica de hibridização "*in situ*" (PNA-FISH) e PCR em tempo real (RT-qPCR)

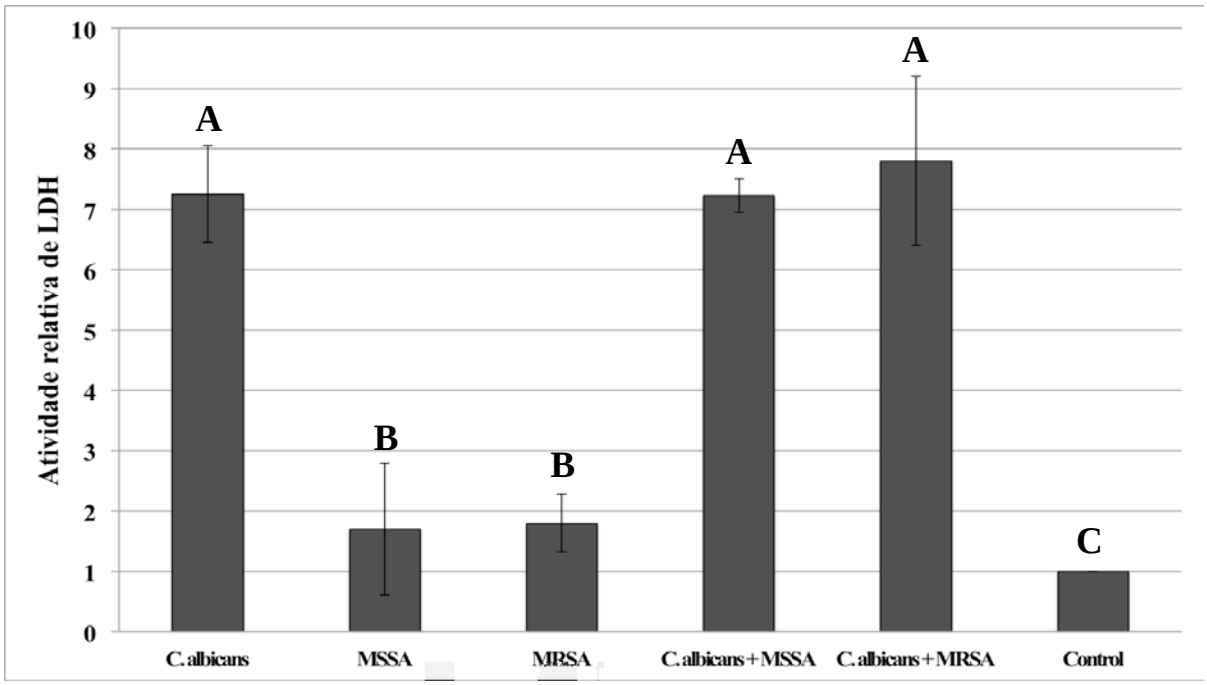
Ensaios			**Micro-organismos**		
			C. albicans	MSSA	MRSA
Colonização			+	+	+
Invasão	Infecções simples		+	-	-
	Infecções mistas	*C. albicans* + MSSA	+	+	N/A
		C. albicans + MRSA	+	N/A	+
qPCR* (médias/DP[§])	Infecções simples		6,61/0,03	6,34/0,05	6,16/0,04
	Infecções mistas	*C. albicans* + MSSA	6,00/0,01	4,85/0,04	N/A
		C. albicans + MRSA	6,75/0,01	N/A	6,86/0,02

*qPCR = log do número de células/mL
[§]DV = desvio-padrão
N/A = não aplicável

Liberação de LDH

Os níveis da atividade de LDH foram medidos após 24 horas de infecções simples e mistas a fim de determinar a extensão do dano do EOHR induzido pelos micro-organismos (Figura 26). Nas infecções simples, *C. albicans* apresentou um maior nível de dano tecidual quando comparado com o dano provocado por ambas bactérias ($\rho<0,001$). Além disso, não houve diferenças significativas entre o dano causado por MSSA e MRSA ($\rho = 1,00$). Quando as bactérias infectaram o tecido na presença de *C .albicans*, um aumento no dano tecidual foi observado em comparação ao dano causado por ambas as bactérias em infecções simples ($\rho<0,001$). Porém, não houve diferenças significativas entre *C. albicans* + MSSA e *C. albicans* + MRSA ($\rho = 0,935$). O dano tecidual causado pelas infecções mistas foi similar ao dano causado pela infecção simples de *C. albicans*. Todas as infecções apresentaram um aumento de atividade de LDH em comparação ao controle (tecido não infectado).

Figura 26 - Atividade relativa da enzima LDH medida no sobrenadante do EOHR após 24 horas de infecções simples e mistas de *C. albicans*, MSSA e MRSA. Barras de erro representam os desvios-padrão. Barras com mesmas letras representam valores sem diferença estatística (ρ>0,05) após ANOVA a um critério com teste "*post-hoc*" de Tukey.



Expressão dos genes de virulência

De maneira geral, todos os genes investigados foram expressos por todos os micro-organismos, independentemente se a expressão foi avaliada em superfície biótica ou abiótica com infecções simples ou mistas (Tabelas 3 e 4). Para *C. albicans*, não houve diferença significativa na expressão de *ALS3* e *HWP1* entre infecções simples e mistas, em ambas superfícies estudadas (Tabela 3).

Para as bactérias, também não foram detectadas diferenças estatísticas na expressão dos genes *clfA, clfB, ssP* e *pl-C* entre as infecções simples e mistas durante a infecção do EOHR. No entanto, em superífice abiótica, a expressão de todos os genes analisados foi sub-regulada durante as infecções mistas em comparação com as respectivas infecções simples (Tabela 4).

Tabela 3 - Médias/Desvios-padrão da expressão relativa de *ALS3* e *HWP1* em infecções simples e mistas de *C. albicans* em EOHR e em biofilmes formados em superfície abiótica utilizando RT-qPCR

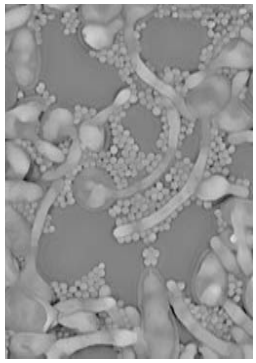
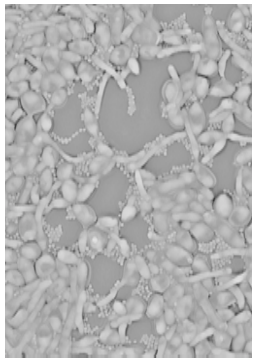
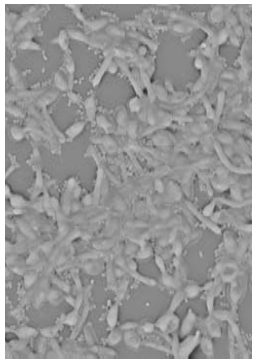
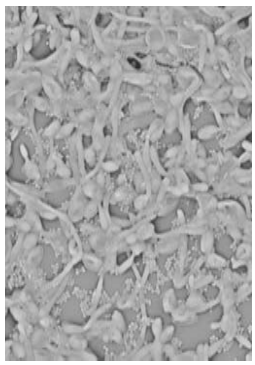
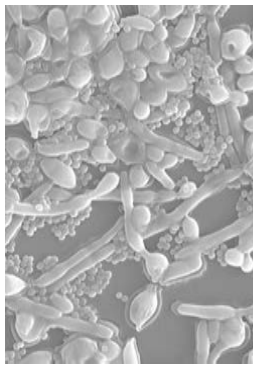
Superfície	**Gene**	**Condição de crescimento**			**ρ** value
		C. albicans	*C. albicans* + MSSA	*C. albicans* + MRSA	
EOHR	*ALS3*	0,89/0,04	0,90/0,03	0,84/0,04	0,142†
	HWP1	0,85/0,05	0,88/0,04	0,84/0,04	0,485†
Abiótica	*ALS3*	0,80/0,02	0,85/0,03	0,80/0,005	0,176§
	HWP1	0,82/0,002	0,84/0,03	0,83/0,02	0,431†

†valores de ρ obtidos por ANOVA a um critério
§valores de ρ obtidos por ANOVA com correção de Welch

Tabela 4 - Médias/Desvios-padrão da expressão relativa de *cflA, cflB, ssP* e *pl-C* em infecções simples e mistas de MSSA e MRSA em EOHR e em biofilmes formados em superfície abiótica utilizando RT-qPCR

Superfície	**Gene**	**Condição de crescimento**					
		MSSA	*C. albicans* + MSSA	**ρ** value	MRSA	*C. albicans* + MRSA	**ρ** value
EOHR	*clfA*	2,05/0,17	2,17/0,12	0,284†	2,14/0,2	2,16/0,08	0,860†
	clfB	1,73/0,13	1,82/0,07	0,260†	1,75/0,06	1,83/0,05	0,116†
	ssP	1,84/0,21	2,08/0,03	0,178§	1,94/0,08	2,03/0,10	0,282†
	pl-C	1,95/0,24	2,21/0,03	0,194§	2,06/0,09	2,21/0,16	0,231†
Abiótica	*clfA*	2,59/0,13	2,18/0,23	0,031§*	2,80/0,34	2,22/0,10	0,04§*
	clfB	2,29/0,04	1,76/0,14	0,003§*	2,28/0,18	1,89/0,12	0,013†*
	ssP	2,36/0,09	1,94/0,10	0,006†*	2,67/0,32	2,09/0,04	0,036†*
	pl-C	2,53/0,10	2,03/0,13	0,006†*	2,82/0,34	2,23/0,05	0,042†*

†valores de ρ obtidos por ANOVA a um critério
§valores de ρ obtidos por ANOVA com correção de Welch
*diferenças significativas entre cada bactéria comparada com seu específico biofilme misto

Discussão

6 Discussão

A cavidade oral é a parte do corpo humano onde se concentra uma das mais complexas comunidades microbianas. Mais de 700 espécies bacterianas foram identificadas colonizando a cavidade oral[26], seja em substratos sólidos, tais como os dentes e próteses, ou em substratos mucosos, tais como periodonto e língua[24,26,82]. Além das bactérias, o ambiente oral também é nicho ecológico para uma diversidade de outras classes filogenéticas[26,37,61,78]. Dependendo das espécies presentes, a natureza das interações de um biofilme polimicrobiano pode variar de sinérgica a antagônica. O presente estudo avaliou a interação entre o fungo *C. albicans* e duas cepas bacterianas de *S. aureus* (MSSA e MRSA) em relação a diferentes fatores de virulência e verificou que estes micro-organismos podem coexistir na forma de biofilmes com um aparente efeito sinérgico, tanto em superfície abiótica como em tecido epitelial.

Os resultados da avaliação dos biofilmes simples e mistos de *C. albicans*, MSSA e MRSA demostraram que, de acordo com a quantificação do número de células, os três micro-organismos apresentaram capacidade de adesão semelhante, com ausência de antagonismo entre as estirpes quando cultivadas simultaneamente (Figura 18). De fato, não foi observada uma redução do número das bactérias ao longo do tempo quando cultivadas na presença de *C. albicans*, indicando a habilidade dessa levedura e das bactérias de co-habitarem o mesmo ambiente. A adesão inicial dos micro-organismos foi seguida pela divisão celular, proliferação e desenvolvimento do biofilme. Assim, também foi possível observar que, sob as condições testadas, todas as estirpes foram capazes de formar biofilmes, embora em diferentes níveis (Figuras 18, 19, 20, 22 e 23). O biofilme de *C. albicans* permaneceu inalterado com relação ao número de células fúngicas entre os biofilmes simples e mistos (Figura 18A). No entanto, é importante enfatizar que *S. aureus* foi mais beneficiado com a

interação entre os micro-organismos, de modo que, na presença de *C. albicans*, o número das bactérias aumentou em períodos específicos de tempo, quando comparado com os biofilmes simples (Figura 18B). Resultados semelhantes também foram observados por Harriott, Noverr[35], que monitoraram o crescimento de biofilmes simples e mistos e observaram que, enquanto os níveis de *C. albicans* não apresentaram nenhuma alteração em relação a biofilmes simples e mistos, os níveis de *S. aureus* foram significativamente maiores quando na presença de *C. albicans*. Uma possível explicação para este fenômeno pode ser a presença de maior quantidade de glicose, principal componente da matriz de *C. albicans*[5]. De fato, a glicose pode servir como fonte de carbono para o crescimento de *S. aureus* e para o aumento da sua formação de biofilme[35].

Ainda, avaliando-se a interação entre os micro-organismos sob a forma de biofilmes, foi realizado o ensaio de atividade metabólica. Como esperado, os resultados demonstraram que, da fase de adesão até a fase de formação de biofilme em 24 horas, a atividade metabólica dos biofilmes simples de *C. albicans* e biofilmes mistos foi maior que a atividade dos biofilmes simples das bactérias. Biofilmes simples de MSSA e MRSA apenas atingiram valores semelhantes de atividade metabólica no período de 48 horas (Figura 19). Como os biofilmes são organizados dentro de comunidades estruturadas, envoltas por uma matriz extracelular, a atividade dentro dos biofilmes pode ser dependente do acesso aos nutrientes e da disponibilidade de oxigênio, juntamente com a capacidade dos micro-organismos removerem os produtos residuais do metabolismo[80]. Esses fatores podem variar devido a diferenças inerentes dos biofilmes formados pelos micro-organismos testados, resultando em variações da atividade metabólica. Outra importante forma de se avaliar o desenvolvimento de um biofilme é por meio da quantificação de sua biomassa total. Através da figura 20, é possível observar que, da mesma forma como ocorreu para atividade metabólica, os biofilmes simples de *C. albicans* e biofilmes mistos produziram maior

biomassa do que os biofilmes simples das bactérias. Bamford et al.[11] investigaram um biofilme formado por *Streptococcus gordonii* e *C. albicans* e também notaram que as complexas interações físicas e químicas entre os micro-organismos resultaram em um aumento de biomassa dos biofilmes coagregados. Mais recentemente, um padrão de interação semelhante foi reportado para *C. albicans* e MRSA[67].

É importante destacar que uma comparação direta entre biomassa total e atividade metabólica pode induzir erros uma vez que existem diferenças significativas entre leveduras e bactérias, incluindo dimensão relativa dos micro-organismos, morfologia e metabolismo. Apesar da literatura ser limitada em relação aos efeitos da interação microbiana na atividade metabólica, os resultados do presente estudo corroboram com um estudo recente, em que biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus* também mostraram maior atividade metabólica do que biofilmes simples das bactérias[41]. Esse resultado é importante, pois a atividade de um biofilme é significativa em termos de patogenicidade uma vez que é um indicador de probabilidade de crescimento, produção de enzimas hidrolíticas e possível resistência à atividade antimicrobiana[80]. A capacidade desses dois micro-organismos de manter o crescimento e a atividade metabólica quando associados pode ter implicações clínicas importantes para infecções polimicrobianas. De fato, um estudo "*in vivo*" demonstrou que camundongos inoculados com culturas simples de *S. aureus* apresentaram menores níveis de mortalidade em relação aos camundongos que foram coinoculados com *C. albicans*[15]. Além disso, um estudo recente constatou que coinfecções desses micro-organismos, além de resultarem em 40% de mortalidade dos camundongos, também provocaram aumento da carga microbiana no baço e rim dos animais em apenas um dia pós-infecção[68], sugerindo que a interação entre estes dois micro-organismos parece ser benéfica para ambos os patógenos**.**

Os três ensaios que avaliaram a interação entre os biofilmes simples e mistos (UFC/mL, XTT e CV) foram selecionados por serem considerados metodologias

complementares. O ensaio de biomassa total (CV) é responsável por quantificar a matriz tanto de células vivas quanto de células mortas[60]. Como esse método cora tanto as células quanto a matriz, ele fornece uma condição geral do biofilme. No entanto, o cristal violeta não quantifica as células viáves ou sua atividade metabólica[60]. Assim, para a discriminação entre células vivas e mortas, o método de quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi escolhido pois, além de ser amplamente utilizado[68,74,80], é considerado o método padrão ouro. A vantagem desse método é que apenas as células viáveis são contadas, excluindo as células mortas e detritos dos biofilmes. No entanto, este método quantifica todas as células viáveis, incluindo aquelas com baixa atividade metabólica. Desta forma, foi selecionado também o método que quantifica a atividade metabólica (XTT) dos biofilmes[60]. Outro importante detalhe do protocolo utilizado foi o tempo de avaliação da interação entre os micro-organismos. Nos ensaios, essa avaliação foi interrompida após 48 horas, uma vez que, neste período de tempo, os biofilmes já estavam suficientemente maduros[20,21,85]. Além disso, este protocolo de formação de biofilme já foi adotado por outros estudos que avaliaram biofilmes simples e mistos[41,92].

Ainda há poucos estudos na literatura que avaliaram a produção de enzimas degradativas específicas em biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. aureus*. A secreção das enzimas avaliadas no presente estudo (SAP e PL-C), quando comparada com outros atributos de virulência, parece ter uma influência mais pronunciada na patogenicidade dos micro-organismos. Lyon et al.[47] encontraram uma correlação positiva entre maior produção de SAP e PL-C e um aumento na adesão às células bucais e maior resistência ao fluconazol em isolados de *C. albicans*. Além disso, há evidências de que a formação de biofilme está positivamente associada com a secreção destas enzimas[69]. No presente estudo, biofilmes simples de MSSA mostraram maior atividade de SAP quando comparado com os biofilmes simples de *C. albicans* que, por sua vez, apresentaram maior atividade de PL-C (Figura 21).

Curiosamente, quando os micro-organismos estavam em cocultura, as duas enzimas foram produzidas (Figura 21), o que sugere um aumento da patogenicidade dos biofilmes mistos. Kaminishi et al.[43] reportaram que a produção de SAP por *C. albicans* parece reduzir a opsonização e fagocitose de *S. aureus* por leucócitos polimorfonucleares. Desse modo, a quebra dos mecanismos de defesa humoral do hospedeiro, causada pela ação da proteinase de *C. albicans,* pode deixar os hospedeiros mais vulneráveis a infecções microbianas e levar ao agravamento de doenças infecciosas em hospedeiros imunocomprometidos. Além disso, a proteinase estafilocócica poderia aumentar a adesão de *C. albicans* à mucosa bucal[29]. O papel específico dessas duas enzimas hidrolíticas no processo de colonização e infecção são ligeiramente diferentes. De forma geral, as SAPs induzem a degradação de uma grande variedade de proteínas do hospedeiro, aumentando a capacidade dos micro-organismos de colonizar e invadir tecidos[43,52]. SAPs também são capazes de quebrar porções de imunoglobulinas, que são glicoproteínas sintetizadas e secretadas pelas células plasmáticas que funcionam como anticorpos. Este mecanismo desempenha um papel importante, perturbando a defesa humoral do hospedeiro[43,52]. As PLs extracelulares são capazes de se ligar e digerir os fosfolipídios, principais componentes das membranas de todas as células do hospedeiro, facilitando, portanto, a invasão dos micro-organismos[32]. Como as PLs estão concentradas principalmente na extremidade das hifas, seus efeitos contra as células do hospedeiro facilitam a penetração e invasão dos patógenos[32]. Além disso, as PLs tem sido descritas como um potente agente inflamatório, induzindo o acúmulo de células inflamatórias e proteínas do plasma, além de induzir a liberação de vários mediadores inflamatórios "*in vivo*"[32]. No presente estudo, para esta quantificação enzimática, foi utilizado o método de fluorimetria, considerado adequado para pesquisas envolvendo biofilmes[89] e estirpes com baixos níveis de atividade enzimática[32]. Esses ensaios fluorimétricos são considerados mais sensíveis do que métodos colorimétricos[74,89] e aqueles métodos que se baseiam na formação

de um halo de degradação opaco em placas de ágar específicos[75]. Apesar disso, não foi possível detectar a secreção de SAP por biofilmes simples de MRSA.

Na análise estrutural dos biofilmes, o presente estudo também mostrou a extensa interação que ocorreu entre *C. albicans* e as bactérias quando cocultivadas e, de forma geral, *C. albicans* favoreceu o crescimento bacteriano. As imagens de MEV revelaram uma adesão extensa de MSSA e MRSA à *C. albicans*, com uma associação preferencial aos elementos invasivos (hifas). Nas áreas de grande crescimento de hifas, foi verificado que *S. aureus* cobriu completamente as hifas do fungo (Figura 23B). Peters et al.[64] também observaram a associação de *S. aureus* com as hifas de *C. albicans* e não com as células leveduriformes (blastóporos). Essa interação foi explorada mais profundamente por esses autores nos anos seguintes, quando foi observado que *S. aureus* liga-se à proteína ALS3 de *C. albicans*, que desempenha um papel fundamental na adesão de células bacterianas às hifas fúngicas[66]. Com base nestes achados, Harriott, Noverr[36] sugeriram que, na formação de biofilmes mistos, inicialmente ocorre a adesão e germinação de *C. albicans* à superfície. Em seguida, ocorre a adesão das bactérias às hifas e, então, o crescimento de ambas as espécies continua concomitantemente. Essa observação é suportada por estudos anteriores que mostraram que microcolônias de *S. aureus* foram encontradas não apenas na superfície como também em toda profundidade dos biofilmes mistos destes micro-organismos[35,36,64,66]. Além disso, tem sido demonstrado que, quando *S. aureus* associa-se a hifas fúngicas, ele passa a ser rodeado por um halo distinto de matriz secretada por *C. albicans*. Como resultado, a tolerância bacteriana aos antibióticos é aumentada, provavelmente devido à ação protetora da matriz que limita a penetração do fármaco no biofilme[35].

Como foi verificado pelos resultados descritos, *C. albicans* e *S. aureus* interagem e podem coexistir em biofilmes. Esses micro-organismos também são capazes de expressar alguns atributos de virulência que contribuem com a patogenicidade específica de cada um.

Em comunidades polimicrobianas, a virulência inerente de cada micro-organismo pode ser consideravelmente alterada, assim como a capacidade de crescimento, de formação de biofilme, invasão e o padrão de suscetibilidade antimicrobiana[35,64,66]. Além dos fatores inerentes aos micro-organismos, diferenças entre espécies hospedeiras também podem influenciar os resultados das infecções[31]. Assim, o uso de modelos que mimetizam o hospedeiro são imperativos para caracterizar a interação e os detalhes moleculares das infecções polimicrobianas[61]. No presente estudo, a fim de melhor representar o ambiente da cavidade oral, um epitélio oral humano reconstituído (EOHR) foi utilizado para caracterizar a interação molecular e para identificar os fatores que podem ser responsáveis pelo sinergismo infeccioso de *C. albicans* e *S. aureus*, espécies frequentemente relatadas coinfectando o ambiente oral[10,24,26,76,78,82].

O padrão de colonização e invasão do EOHR por culturas simples e mistas foi examinado após um período de 24 horas de infecção. Os resultados obtidos mostraram que a superfície do EOHR foi colonizada com sucesso por todas as estirpes em infecções simples (Figura 24). Além disso, foi possível observar que infecções simples de *C. albicans*, além de colonizar, também foram capazes de invadir o tecido, com as hifas penetrando totalmente as camadas do EOHR (Figura 24A). Alteração na estrutura dos queratinócitos também foram induzidas pelas infecções simples de *C. albicans* (Fig. 24A), corroborando com estudos anteriores[8,80]. Em contraste, a invasão do epitélio por ambas as estirpes bacterianas em infecções simples não foi evidente e nenhuma alteração da estrutura dos queratinócitos foi observada (Figura 24B e C). Peters et al.[66] também revelaram uma invasão extensiva das hifas de *C. albicans* em línguas de camundongos, enquanto a presença de *S. aureus* durante infecções simples foi limitada às camadas mais externas das línguas infectadas. Quando o EOHR foi coinfectado pelas cepas fúngica e bacterianas, resultados diferentes foram observados. Por meio das imagens 25A e B, é possível notar que o grau de colonização e

invasão de *C. albicans* na presença das bactérias não foi alterado. No entanto, na infecção mista, é possível observar a presença de células bacterianas nas camadas mais profundas do epitélio. As imagens revelam, ainda, uma adesão de MSSA e MRSA às hifas de *C. albicans*, o que pode ter facilitado essa invasão bacteriana. A alta afinidade de *S. aureus* com as hifas de *C. albicans* é clinicamente relevante, uma vez que esta interação pode promover a disseminação de bactérias para o sistema circulatório. Na verdade, tem sido estimado que um número significativo de 40-50% dos casos de infecções estafilocócicas da corrente sanguínea, sem portal de entrada claramente estabelecido, tenham infecções por *Candida* (candidose oral) como causa subjacente[76]. Vale destacar que esta interação sinérgica entre os micro-organismos quando em infecção tecidual está em acordo com os resultados do ensaio molecular utilizado para quantificar os micro-organismos (Tabela 2). Com exceção do MSSA, que apresentou ligeira redução no número de células quando coinfectado juntamente com *C. albicans*, não foram verificadas alterações quantitativas relevantes nos demais micro-organismos quando em infecção simples e mistas.

A análise das imagens do EOHR demonstra o grau de colonização e invasão tecidual pelos biofilmes. No entanto, também é de extrema relevância avaliar a extensão do dano tecidual por meio da quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) durante coinfecções simples e mistas. Como pode ser verificado na Figura 26, nas infecções simples, *C. albicans* causou maior dano tecidual quando comparado ao dano causado por ambas as bactérias, não havendo diferença significativa entre os danos causados por MSSA e MRSA. Este resultado era esperado e está relacionado à capacidade que *C. albicans* apresenta de formar hifas. Neste estado morfológico, o fungo é capaz de perfurar as camadas epiteliais[64,66], resultando na invasão fúngica e em maior dano tecidual. Além disso, nas extremidades das hifas há algumas enzimas degradativas, como a PL-C, que contribuem com o processo invasivo[32]. Quando as bactérias infectaram o tecido na presença de *C. albicans*,

um aumento similar no dano tecidual causado pela infecção fúngica foi observado, sugerindo maior patogenicidade de *C. albicans*. No entanto, infecções mistas apresentaram dano tecidual superior àquele causado por ambas as bactérias em infecções simples. Este resultado é ligeiramente divergente daquele obtido nas imagens de fluorescência, onde o dano tecidual gerado pelas infecções mistas foi, aparentemente, superior ao dano causado pelas infecções simples de *C. albicans*, provavelmente, porque nos biofilmes mistos há modulação e adição dos fatores de virulência de cada uma das espécies. Outro aspecto importante, foi que apesar do número de MSSA ter reduzido 1,49 log na presença de *C. albicans* o dano tecidual causado pela infecção mista de *C. albicans* + MSSA não foi significativamente diferente do dano causado pela infecção mista de *C. albicans* + MRSA, uma possível explicação para este resultado, poderia ser o fato da técnica de quantificação por RT-qPCR não fazer distinção entre células vivas e mortas.

O presente estudo avaliou também os detalhes moleculares envolvidos na interação entre *C. albicans* e *S. aureus*. Para esta finalidade, estudos anteriores utilizaram animais[66,76], os quais não são portadores orais naturais de *C. albicans*[8] e *S. aureus*[95], resultando em uma relevância questionável desses modelos para a situação humana. Assim, um ensaio molecular com EOHR foi utilizado e a expressão de diferentes genes por *C. albicans* (*ALS*3 e *HWP*1) e *S. aureus* (*clfA, clfB, ssP e pl-C*) foi avaliada. Apesar de diferenças significativas na expressão destes genes não terem sido verificadas entre infecções simples e mistas, todos os genes avaliados foram expressos, independentemente das condições experimentais (Tabelas 3 e 4). Este resultado é altamente relevante, tendo em vista que os genes selecionados são atributos de virulência fundamentais para estes micro-organismos. De fato, estes genes têm participação nos processos de adesão, colonização e degradação do tecido do hospedeiro, considerados fundamentais para o estabelecimento de processo infeccioso[26,31,33,76,78].

A morfogênese da *C. albicans*, um de seus principais atributos de virulência, é acompanhada por sobre-regulação de genes expressos nas hifas, como *ALS3* e *HWP1*[42]. A expressão gênica de *ALS3* nas hifas pode ser um fator chave regulador da adesão de *S. aureus* à *C. albicans*[57,66,76]. Um estudo demonstrou que um elevado número de *S. aureus* foi recuperado a partir de camundongos coinfectados com cepas de *C. albicans* secretoras de *ALS3*, enquanto que a mesma bactéria não foi encontrada nos rins dos camundongos inoculados na ausência de *C. albicans* ou na presença de *C. albicans* mutante que não expressava *ALS3*[76]. Para confirmar o papel desta adesina como um receptor para *S. aureus*, a expressão heteróloga de *ALS3* em cepa de *S. cerevisiae* foi utilizada[66]. Apesar de *S. aureus* não se ligar a cepa parental de *S. cerevisiae*, quando conferida à essa levedura a capacidade de expressar *ALS3* na superfície da parede celular, os cocos apresentaram uma forte adesão ao fungo[66]. As imagens de MEV e fluorescência obtidas no presente estudo corroboram com esses resultados, visto que, em coinfecções, uma intensa interação entre os micro-organismos foi observada, com nítida preferência das bactérias pelas hifas de *C. albicans*. Assim como a *ALS3*, o *HWP1* funciona em diferentes processos, tais como a adesão e formação de biofilme[25]. Em um modelo de infecção "*in vivo*" em camundongos, uma estirpe de *C. albicans* mutante, deficiente de *HWP1*, causou mortalidade reduzida dos camundongos, gerando menores danos às células endoteliais e menor recolhimento do número de células nos rins dos camundongos infectados[93] quando comparado a estirpe parental de tipo selvagem.

As adesinas bacterianas clfA e clfB também desempenham um papel importante nos processos de adesão e colonização de *S. aureus*. Mais especificamente, a clfB promove a adesão à citoqueratina 10[55], principal componente das células escamosas[14]. De fato, cepas de *S. aureus* deficientes em clfB apresentaram redução na ligação às células escamosas nasais quando comparadas às células de *Lactococcus lactis* que expressaram heterologamente *clfB*[55]. O gene *clfA* está presente em todas as fases de crescimento de *S. aureus*[30] e além de promover

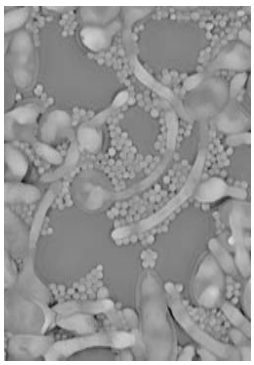
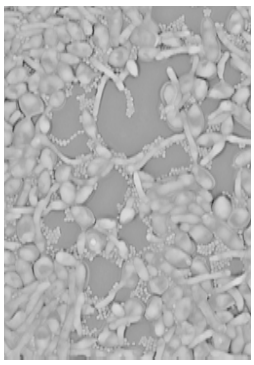
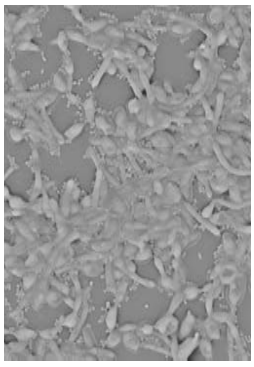
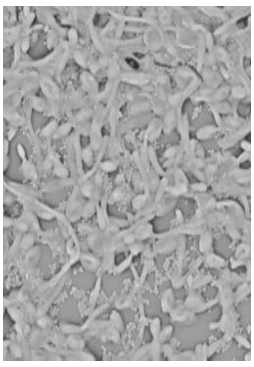
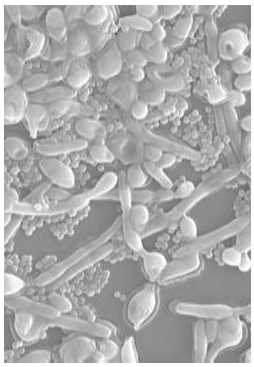
a adesão e colonização, desempenha um importante papel na evasão da resposta imune, reduzindo a opsonofagocitose[31]. Em um modelo de endocardite em camundongos, uma cepa de *S. aureus* mutante deficiente de clfA foi significativamente menos virulenta do que a estirpe do tipo selvagem[30]. Os genes de enzimas degradativas SAP e PL-C (*ssP* e *pl-C*) conferem ao *S. aureus* a habilidade de invadir e destruir os tecidos e metastatizar para outros locais[33,52]. Vale ressaltar que, um dos fatores que pode ter influenciado os resultados obtidos na análise de expressão gênica foi o período de infecção avaliado (24 horas). Como os genes *ALS3*, *HWP1*, *clfA* e *clfB* estão principalmente relacionadas à fase de adesão, seria interessante uma análise em tempos iniciais de infecção, onde diferentes resultados poderiam ser observados. Da mesma forma, uma superior expressão de *ssP* e *pl-C* poderia ter sido verificada se tempos posteriores tivessem sido avaliados. Considerando estas possíveis limitações do estudo, futuras investigações seriam importantes para melhor elucidar os resultados obtidos.

Além de superfícies mucosas, *C. albicans* e *S. aureus* também são capazes de aderir e persistir na forma de biofilmes em superfícies abióticas[10,24,26,67,78,82,85], servindo como um reservatório de patógenos[37,82]. Esse reservatório de patógenos pode causar efeitos sinérgicos sobre morbidade e mortalidade[15,37,66,76] durante as infecções sistêmicas. Assim, o presente estudo também avaliou a expressão gênica pelos micro-organismos em biofilmes formados sobre placas de poliestireno. Nestas condições de crescimento, todos os genes avaliados foram expressos (Tabelas 3 e 4). Além disso, um resultado de destaque é que, em biofilmes mistos, apesar da expressão gênica de *C. albicans* não ter sido afetada pela presença das bactérias (Tabela 3), as bactérias apresentaram redução da expressão de todos os genes investigados na presença de *C. albicans* (Tabela 4). Várias hipóteses podem ser sugeridas para elucidar este resultado. Como discutido acima, *S. aureus* tem uma elevada afinidade para aderir às hifas quando cocultivado com *C. albicans*, o que confere às bactérias a capacidade

de invasão dos tecidos por meio de um fenômeno descrito como "carona"[76]. Tendo em conta que *C. albicans* secreta adesinas e enzimas degradativas durante a invasão tecidual, é possível que *S. aureus* não expresse seus atributos de virulência para estas funções, economizando energia para expressar outros genes igualmente importantes. Os micro-organismos também podem combinar os seus recursos genéticos em um biofilme polimicrobiano, de modo que cada um dos membros do biofilme não necessite expressar todos os genes para realizar uma mesma função[97]. Além disso, *S. aureus* pode regular negativamente a sua virulência enquanto coexiste com *C. albicans* como uma estratégia para permanecer em um estado comensal, evitando assim a detecção e eliminação pelo sistema imune do hospedeiro[64]. É importante destacar que na condição de formação de biofilme sobre superfície abiótica, importantes sinalizadores produzidos pelas células epiteliais não estão presentes, diminuindo o fator indutor de produção de proteínas específicas para invasão tecidual pelas bactérias.

As infecções mono e polimicrobianas são processos complexos, regulados por um equilíbrio dinâmico entre as defesas imunes do hospedeiro, a interação entre os micro-organismos e seus fatores de virulência. O presente estudo demonstrou "*in vitro*" que *C. albicans*, MSSA e MRSA coexistem em biofilmes e infecções de EOHR, com um aparente efeito sinérgico entre eles e com as bactérias associadas preferencialmente às hifas. Neste estudo, os biofilmes mistos mostraram um comportamento evolutivo ao longo do tempo em termos do número de células, atividade metabólica e biomassa total. Quando *C. albicans*, MSSA e MRSA foram cocultivados, as enzimas SAP e PL-C foram produzidas e todos os genes avaliados foram expressos, sugerindo um aumento da severidade das culturas mistas tanto na forma de biofilmes quanto em infecções teciduais. Além disso, as imagens de fluorescência demonstraram que houve um benefício das bactérias quando coinfectaram o tecido juntamente com *C. albicans*, elucidando o impacto que esta interação pode ter clinicamente. Embora estes resultados sejam importantes e, nos últimos anos, investigações

terem sido redirecionadas para interações entre *C. albicans* e *S. aureus*, ainda existem lacunas consideráveis sobre os detalhes da adesão e interações microbianas. Isso ocorre sobretudo porque, quando os micro-organismos encontram-se associados em consórcios polimicrobianos, há uma expressão diferencial dos atributos de virulência de cada uma das espécies, estabelecendo a ocorrência de um processo dinâmico e interativo entre estes dois agentes patogênicos[78]. Portanto, caracterizar a complexa interação entre estas duas espécies microbianas é o primeiro passo para entender a natureza dessa coexistência em um hospedeiro. Além disso, a identificação de potenciais alvos para a inibição da coadesão e do desenvolvimento de biofilmes pode vir a fornecer meios para modificar a colonização microbiana e, assim, impedir o desenvolvimento da doença polimicrobiana.

Conclusão

7 Conclusão

Com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

1. *C. albicans*, MSSA e MRSA foram capazes de coexistir em biofilme com ausência de antagonismo;

2. Foi verificado um aparente efeito sinérgico entre os micro-organismos com as bactérias aderidas preferencialmente às hifas de *C. albicans*;

3. De maneira geral, os biofilmes mistos mostraram um comportamento evolutivo ao longo do tempo em termos de viabilidade celular, atividade metabólica, e biomassa total;

4. Coculturas de *C. albicans* e bactérias apresentaram a produção de SAP e PL-C, sugerindo uma maior patogenicidade dos biofilmes mistos;

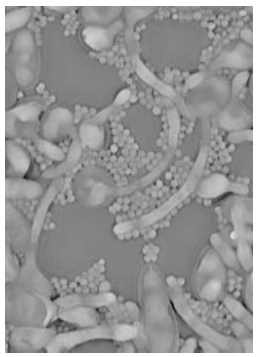
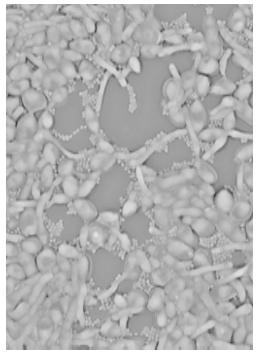
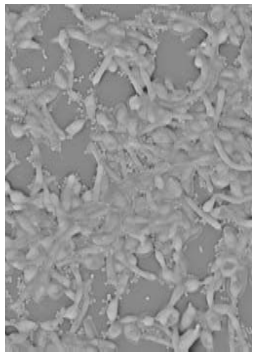
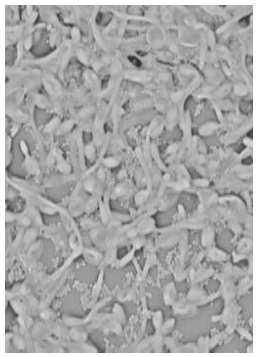
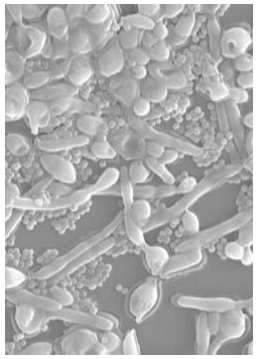
5. Infecções simples de *C. albicans*, MSSA e MRSA foram capazes de colonizar o EOHR. *C. albicans*, além de colonizar, também invadiu o tecido, com as hifas penetrando todas as camadas do epitélio;

6. Somente em infecções mistas, as bactérias foram capazes de invadir o epitélio.

7. Infecções simples de *C. albicans* e infecções mistas induziram maior dano tecidual quando comparado ao dano bacteriano;

8. Todos os genes avaliados foram expressos durante a infecção de EOHR e a formação de biofilmes na superfície abiótica, independentemente das condições experimentais;

9. De forma geral, *S. aureus* se beneficiou mais da interação do que *C. albicans*.

Referências

Referências*

1. Abe S, Ishihara K, Okuda K. Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. Arch Gerontol Geriatr. 2001; 32(1): 45-55.
2. Abraham NM, Jefferson KK. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. Microbiology. 2012; 158(6): 1504–12.
3. Adam B, Baillie GS, Douglas JL. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. J Med Microbial. 2002; 51(4): 344-9.
4. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002; 78(922): 455-9.
5. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J. Med Microbiol. 2006; 55(8): 999–1008.
6. Al Groosh D, Roudsari GB, Moles DR, Ready D, Noar JH, Pratten J. The prevalence of opportunistic pathogens associated with intraoral implants. Lett Appl Microbiol. 2011; 52(5): 501-5.
7. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Am Dent Assoc. 2012; 143(3): 270-7.
8. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. J Infect. 2014; 69(4): 396-407.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual

9. Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Kuroda K, Ueda M. Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (*ALS*) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012; 65(1): 121–4.
10. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez Vargas LO. *Candida albicans, Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005; 10: 27–39.
11. Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. Infect Immun. 2009; 77(9): 3696-704.
12. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9(7): 327-35.
13. Calderone R. *Candida* and Candidiasis. ASM Press. 2002; 1752 N St. NW, Washington, DC 20036-2904, USA.
14. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6(4): 328–40.
15. Carlson E. Synergistic effect of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* on mouse mortality. Infect Immun. 1982; 38(3): 921-4.
16. Carlson E. Effect of strain of *Staphylococcus aureus* on synergism with *Candida albicans* resulting in mouse mortality and morbidity. Infect Immun. 1983; 42(1): 285–92.
17. Carlson E, Johnson G. Protection by *Candida albicans* of *Staphylococcus aureus* in the establishment of dual infection in mice. Infect Immun. 1985; 50(3): 655–9.

18. Carlson E. Synergism of *Candida albicans* and delta toxin producing *Staphylococcus aureus* on mouse mortality and morbidity: protection by indomethacin. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. 1988; 269(3): 377–86.
19. Chadwick PR. Revised UK guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. Int J of Antimicrob Agents. 1999; 11(2): 89-91.
20. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001; 80(3): 903-8.
21. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 183(18): 5385-94.
22. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003; 36(1): 53-9.
23. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284(5418): 1318-22.
24. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. Acta Odontol Latinoam. 2010; 23(1): 20-6.
25. de Groot PW, Bader O, de Boer AD, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. Eukaryot Cell. 2013; 12(4): 470–81.
26. Demuyser L, Jabra-Rizk MA, Van Dijck P. Microbial cell surface proteins and secreted metabolites involved in multispecies biofilms. Pathog Dis. 2014; 70(3): 219–30.

27. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 167-93.

28. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11(1): 30-6.

29. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. J Appl Microbiol. 2004; 96(5): 1067–73.

30. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 1998; 6(12): 484-8.

31. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK and Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol. 2014; 12(1): 49-62.

32. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(1): 122-43.

33. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis. 2008; 46(5): 350-9.

34. Habash M, Reid G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. J Clin Pharmacol. 1999; 39(9): 887-98.

35. Harriott MM, Noverr M. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(9): 3914-22.

36. Harriott MM, Noverr MC. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(9): 3746–55.

37. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2011; 19(11): 557–63.

38. Honma K, Tawara Y, Okuda K. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human saliva and on denture surfaces. Bull Tokyo Dent Coll. 1994; 35(4): 217-20.

39. Hua X, Yuan X, Mitchell BM, Lorenz MC, O'Day DM, Wilhelmus KR. Morphogenic and genetic differences between *Candida albicans* strains are associated with keratomycosis virulence. Mol Vis. 2009; 15: 1476-84.

40. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. J Am Dent Assoc. 1992; 123(1): 46-51.

41. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitan-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sanchez-Vargas LO. Formation and quantification assay of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* mixed biofilm. Rev Iberoam Micol. 2012; 29(4): 214-22.

42. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10(1): 85–93.

43. Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, et al. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. Infect Immun. 1995; 63(3): 984-8.

44. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke NP. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 59(4): 401–6.

45. Klotz SA, Gaur NK, De Armond R, Sheppard D, Khardori N, Edwards JE Jr, et al. *Candida albicans ALS* proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. Med Mycol. 2007; 45(4): 363–70.

46. Lu WP, Sun Y, Bauer MD, Paule S, Koenigs PM, Kraft WG. Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with beta-lactams using electrospray mass spectrometry. Biochemistry. 1999; 38(20): 6537-46.
47. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102(5): 632-8.
48. Maeda Y, Kenny F, Coulter WA, Loughrey A, Nagano Y, Goldsmith CE, et al. Bactericidal activity of denture-cleaning formulations against planktonic health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control. 2007; 35(9): 619-22.
49. Marsh P, Martin MV. Oral microbiology 4th ed. Oxford: Wright; 1999.
50. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog. 2010; 6(4): e1000886.
51. Mylotte J. Nursing home-acquired pneumonia. Clin Infect Dis. 2002; 35(10): 1205-11.
52. Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, et al. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect Immun. 1999; 67(5): 2482-90.
53. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67(3): 400–28.
54. Naughton B, Mylotte J, Tayara A. Outcome of nursing home-acquired pneumonia: derivation and application of a practical model to predict 30 day mortality. J Am Geriatr Soc. 2000; 48(10): 1292-9.

55. O'Brien LM, Walsh EJ, Massey RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (*clfB*) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cell Microbiol. 2002; 4(11): 759–70.

56. Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemoto TK. Occurrence of *staphylococci* in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. J Med Microbiol. 2008; 57(1): 95-9.

57. Ovchinnikova ES, Krom BP, Busscher HJ, van der Mei HC. Evaluation of adhesion forces of *Staphylococcus aureus* along the length of *Candida albicans* hyphae. BMC Microbiol. 2012; 12: 281.

58. Owen MK. Prevalence of oral methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an institutionalized veterans population. Spec Care Dentist. 1994; 14(2): 75-9.

59. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E. Expression of *staphylococcal* clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. Microbes Infect. 2004; 6(2): 188–95.

60. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008; 72(2):157-65.

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

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

63. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Med Mycol. 2007; 45(4): 321–46.

64. Peters BM, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus-Candida albicans* dual-species biofilms. FEMS Immunol Med Microbial. 2010; 59(3): 493-503.

65. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton WJ, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(1): 193-213.

66. Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin *ALS3*p. Microbiology. 2012; 158(12): 2975-86.

67. Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(1): 74-82.

68. Peters BM, Noverr MC. *Candida albicans-Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. Infect Immun. 2013; 81(6): 2178–89.

69. Rajendran R, Robertson DP, Hodge PJ, Lappin DF, Ramage G. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type I diabetes. Mycopathologia. 2010; 170(4): 229-35.

70. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Prevalence of *Candida* spp. associated with bacteria species on complete dentures. Gerodontology. 2012; 29(3): 203-8.

71. Rossi T, Peltonen R, Laine J, Eerola E, Vuopio-Varkila J, Kotilainen P. Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. J Hosp Infect. 1996; 34(4): 311-20.

72. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BP, Jayatilake JA, Yeung KW, Yau JY, et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. APMIS. 2006; 114(12): 857-66.

73. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 111(6): 726-33.

74. Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, et al. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014; 118(1): 84-91.

75. Sanitá PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. Mycoses. 2014; 57(6): 351-7.

76. Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. Microbiology. 2015; 161(1): 168-81.

77. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 2004; 150(1): 217-28.

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

79. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol. 2009; 47(7): 681-9.

80. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans Candida* species. Curr Microbiol. 2010; 61(6): 534-40.

81. Simor AE, Phillips E, McGeer A, Konvalinka A, Loeb M, Devlin HR, et al. Randomized controlled trial of chlorhexidine gluconate for washing, intranasal mupirocin, and rifampin and doxycycline versus no treatment for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. Clin Infect Dis. 2007; 44(2): 178-85.

82. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. J Med Microbiol. 2001; 50(11): 940-6.

83. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J. 2003; 195(12): 701-3;

84. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J Med Microbiol. 2008; 57(8): 966-73.

85. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(4): 374-8.

86. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000; 40(2): 175-9.

87. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004; 12(7): 317-24.

88. Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, Michiwaki Y, Sakagami N. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. Gerodontology. 2002; 19(1): 25-9.

89. Taniguchi L, de Fatima Faria B, Rosa RT, de Paula E Carvalho A, Gursky LC, Elifio-Esposito SL, et al. Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. J Microbiol Methods. 2009; 78(2): 171-4.

90. Tawara Y, Honma K, Naito Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. Bull Tokyo Dent Coll. 1996; 37(3): 119–28.

91. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. J Am Geriatr Soc. 2001; 49(5): 557-63.

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

93. Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, French SW, Edwards JE Jr, Filler SG. Reduced adherence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. Infect Immun. 2000; 68(4): 1997–2002.

94. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. Gerodontology. 2005; 22(3): 168-76.

95. Wertheim HF, Walsh E, Choudhurry R, Melles DC, Boelens HA, Miajlovic H, et al. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. PLoS Med. 2008; 5(1): 17.

96. White MJ, Boyd JM, Horswill AR, Nauseef WM. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C contributes to survival of *Staphylococcus aureus* USA300 in human blood and neutrophils. Infect Immun. 2014; 82(4): 1559-71.

97. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(2): 107-12.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor).
Araraquara, 27 de Março de 2015.

Chaiene Evelin Zago