Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Avaliação da ativação de Resposta Imune em Macrófagos J774 A.1 na presença de metabólitos de biofilmes isolados e polimicrobiano de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus.*

VIRGÍNIA BARRETO LORDELLO

Araraquara

2017

VIRGÍNIA BARRETO LORDELLO

Avaliação da ativação de Resposta Imune em Macrófagos J774 A.1 na presença de metabólitos de biofilmes isolados e polimicrobiano de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Co-Orientadora: Dra. Paula Aboud Barbugli

Araraquara

2017

“Criador inefável,
Tu que és a fonte verdadeira da luz e da ciência,
derrama sobre as trevas da minha inteligência um raio da tua claridade.
Dá-me inteligência para compreender,
memória para reter,
facilidade para aprender,
sutileza para interpretar,
e graça abundante para falar.
Meu Deus, semeia em mim a semente da tua bondade.
Faz-me pobre sem ser miserável,
humilde sem fingimento,
alegre sem superficialidade,
sincero sem hipocrisia;
que faça o bem sem presunção,
que corrija o próximo sem arrogância,
que admita a sua correção sem soberba,
que a minha palavra e a minha vida sejam coerentes.
Concede-me, Verdade das verdades,
inteligência para conhecer-Te,
diligência para Te procurar,
sabedoria para Te encontrar,
uma boa conduta para Te agradar,
confiança para esperar em Ti,
constância para fazer a Tua vontade.
Orienta, meu Deus, a minha vida,
concede-me saber o que tu me pedes
e ajuda-me a realizá-lo
para o meu próprio bem
e de todos os meus irmãos.

Amém”.

(São Tomás de Aquino)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e por todos os dons e oportunidades que Ele me concedeu. De tantas formas pude ver a Providência Divina nesses seis anos de graduação.

Agradeço aos meus pais, Fátima Maria e Antônio Fernando, pelo enorme esforço realizado para que eu pudesse ter a melhor educação disponível e por todas as caronas as seis horas da manhã, ou as dez horas da noite, quando eu precisava executar os experimentos.

Agradeço à minha irmã, Fernanda, por ter sido meu suporte nos momentos difíceis nos quais eu quis desistir, por ser a ouvinte número um das minhas reclamações e, também, por todas as caronas. À minha irmã mais velha, Renata, por nunca deixar de expressar seu amor e sua admiração por mim e por minhas conquistas. Agradeço aos meus avós, a todos familiares e amigos por todo apoio que sempre recebi.

À Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani pela orientação e confiança concedidas.

À minha Co-Orientadora Dra. Paula Aboud Barbugli por todo conhecimento compartilhado, pelas horas dedicadas a mim e ao meu trabalho, por toda paciência, confiança e carinho.

Agradeço a todos pós-graduandos e técnicos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo treinamento, dicas e ajuda no desenvolvimento dos experimentos. De forma especial, gostaria de agradecer à Kassia, que sempre esteve pronta a me ajudar e me ensinar. Sem dúvidas, uma excelente profissional que, em breve, se tornará uma excelente docente.

Agradeço às meninas do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: à Letícia, por ter me ajudado com os experimentos e por ter me salvado tantas vezes e ter me

ensinado tanto! E à Amanda pela ajuda com a dosagem de NO.

A todos os amigos que ganhei nessa graduação, em especial à Aline, Bia, Stefane, Nayara, Isabela, Juliana e Diego pelas melhores memórias desse período da minha vida e por terem se tornado amigos para a vida inteira!

De forma geral, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP com todos seus docentes, funcionários e técnicos por ter me concedido as melhores experiências da minha vida e por ter formado, não apenas a profissional, como também, a pessoa que sou hoje.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Tubos criogênicos contendo as cepas *Candida albicans* SC5314 e *Staphylococcus aureus* suscetível à Meticilina (MSSA) ATCC25923.....27

Figura 2: Desenho Experimental do Estímulo dos Macrófagos J774A.1 com os cinco grupos experimentais.....33

Figura 3: Esquema de armazenamento do sobrenadante da cultura celular estimulada pelos cinco grupos experimentais.....34

Figura 4: Ensaio de viabilidade celular (MTT) dos Macrófagos J774A.1 estimulados com os cinco grupos experimentais.....36

Figura 5: Desenho experimental dos testes de detecção de citocinas produzidas por macrófagos J774A.1 após estimulo de 24 horas com os cinco grupos experimentais.....39

Gráfico 1: Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 estimulados por 24h.....41

Gráfico 2: Produção de IL-6 por macrófagos J774.A1 estimulados por 24h.....43

Gráfico 3: Produção de NO por macrófagos J774.A1 estimulados por 24h.....44

Gráfico 4: Produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados por 24h.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de média, desvio padrão, intervalo de confiança, valor mínimo e máximo de log_{10} UFC/mL para o crescimento de *C. albicans* e MSSA em biofilmes simples e polimicrobianos com 36 horas de formação em três ocasiões distintas realizadas em triplicata.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **α-toxina:** Alfa-toxina
- **agr:** *Accessory gene regulator* (gene acessório regulador)
- **ATCC:** *American Type Culture Collection*
- **BCRJ:** Banco de células do Rio de Janeiro
- **BHI:** *Brain Heart Infusion*
- ***C. albicans:*** *Candida albicans*
- **CO_2:** Dióxido de carbono
- **cNOS:** Óxido nítrico Sintase constitutiva
- **DMEM:** *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*
- **DO:** Densidade óptica
- **DP:** Desvio padrão
- **eDNA:** *Extracelular DNA*
- **ELISA:** Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
- **EPS:** Matriz polissacarídica extracelular
- **FnBPs:** Proteínas ligantes de fibronectina
- **g:** Gramas
- **H_2O:** Água
- **H_3PO_4:** Ácido fosfórico
- **IC:** Intervalo de confiança
- **ica:** *Intracelular adhesion* (gene de adesão intracelular)
- **IFN-γ***:* Interferon gama
- **IL-1β:** Interleucina 1 beta
- **IL-6:** Interleucina 6
- **IL-8:** Interleucina 8
- **IL-10:** Interleucina 10
- **IL-12:** Interleucina 12
- **iNOS:** Óxido nítrico Sintase induzida
- **L:** Litros
- **Ldh1:** L-lactato desidrogenase 1
- **LI:** Limite inferior
- **Log_{10}:** Logaritmo na base 10
- **LS:** Limite superior
- **µl:** Microlitros
- **µm:** Micrômetros
- **µM:** Micromolar
- **mg:** Miligramas
- **MHC II:** Complexo de histocompatibilidade do tipo II
- **mL:** Mililitros
- **mM:** Milimolar
- **MOPS:** *3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid hemisodium salt*
- **MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina
- **MSCRAMMS:** Componentes da superfície microbiana reconhecedora de moléculas adesivas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **MSSA:** *Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina
- **MTT:** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio brometo]
- **NaCl:** Cloreto de sódio
- **NaH_2PO_4:** Dihidrogenofosfato de sódio
- **nm:** Nanômetros
- **NO:** Óxido nítrico
- **NOS:** Óxido nítrico sintase.
- **O_2:** Oxigênio
- **PBS:** *Phosphate buffered salin*e ou tampão fosfato-salino
- **pg:** Picogramas
- **PIA:** *Polysaccharide intercellular antigen (*antígeno polissacarídeo intercelular)
- **PL-C:** Fosfolipase C
- **Rpm:** Rotações por minuto
- **RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura)
- **SAP:** Aspartil protease secretada
- **sarA:** *Staphylococcal accessory regulator*
- **SC**: *Spanish Collection*
- **SDA:** *Sabouraud Dextrose Agar*
- **SFB:** Soro fetal bovino
- **TLR:** Receptor *Toll-like*
- **TNF- α:** Fator de necrose tumoral alfa
- **TSB:** *Tryptic Soy Broth*
- **UFC:** Unidades formadoras de colônia.
- **UI:** Unidades Internacionais
- **xg:** Força centrífuga relativa
- **YEPD***:* Y*east Extract Peptone Dextrose*
- **YNB:** *Yeast Nitrogen Base*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO: 11

2. REVISÃO DE LITERATURA: 15

2.1. *Staphylococcus aureus:* 15

2.2. *Candida albicans:* 17

2.3. Biofilmes Polimicrobianos: 19

2.4. Macrófagos e a secreção de citocinas: 21

3. OBJETIVO: 26

4. MATERIAIS E MÉTODOS: 27

5. RESULTADOS: 40

5.1. Caracterização dos biofilmes: 40

5.1.1. Quantificação de microrganismos nos biofilmes: 40

5.1.2. Caracterização dos biofilmes: pH 40

5.2. Ensaio de viabilidade celular (MTT): 41

5.3. Dosagem de citocinas produzidas pelos macrófagos J774A.1 42

5.3.1. Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 1β (IL-1β) 42

5.3.2. Interleucina 6 (IL-6): 43

5.3.3. Óxido Nítrico (NO): 44

5.3.4. Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α): 45

6. DISCUSSÃO: 46

7. CONCLUSÃO: 50

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 51

ANEXO A 57

RESUMO:

Biofilmes são ecossistemas microbianos complexos, envoltos por uma matriz de polímero extracelular, que por sua vez, confere proteção e diversas vantagens ao patógeno, promovendo infecções perenes e altamente resistentes à farmacoterapia.

Este trabalho teve como objetivo melhorar o entendimento da resposta imunológica provocada por metabólitos de biofilmes de culturas isoladas e polimicrobianas de *Candida albicans* e de *Staphylococcus aureus* suscetível à Meticilina (MSSA) sobre cultura de macrófagos murinos (J774A.1).

Os biofilmes e seus sobrenadantes, com 36 horas de formação, de *C. albicans* e MSSA, bem como, do biofilme polimicrobiano destes dois microrganismos foram processados e filtrados e colocados em contato com os macrófagos J774A.1 por 24 horas, na diluição 1:4 (Sobrenadante filtrado em meio de cultura dos macrófagos). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT. A produção de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α) foi analisada por meio do teste de ELISA, a produção de NO foi analisada pelo método colorimétrico de Griess. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os dados da quantificação de citocinas mostraram que, o estímulo pelo biofilme de MSSA levou a uma maior produção de NO, IL-6 e TNF-α quando comparados aos grupos estimulados pelos outros biofilmes. As citocinas IL-1β e IL-10 não foram detectadas no sobrenadante da cultura de macrófagos.

A menor produção de citocinas na co-cultura de fungo e bactéria pode estar relacionada à algum efeito provocado por *C. albicans* em MSSA ou nos macrófagos e, portanto, esse efeito com potencial anti-inflamatório, deve ser mais profundamente explorado através da utilização de outros parâmetros e métodos investigativos.

Palavras-chave: Biofilmes, *Staphylococcus aureus* suscetível à Meticilina (MSSA), *Candida albicans*, biofilmes polimicrobianos, macrófagos J774.A1, citocinas, resposta inflamatória.

1. INTRODUÇÃO:

Biofilmes podem ser definidos como um ecossistema microbiano séssil, caracterizado por células ligadas entre si, a um substrato, ou a superfícies bióticas e abióticas (FINKEL; MITCHELL, 2011). Um biofilme maduro é formado quando as células microbianas, inicialmente isoladas, colonizam uma superfície, agregam-se, crescem em colônias multicelulares, e envolvem-se em uma matriz de polímero extracelular (EPS) (CAIAZZA; O'TOOLE, 2003).

Os biofilmes exibem um fenótipo alterado no que se refere ao crescimento microbiano, à expressão de genes e à produção de proteínas (DONLAN; COSTERTON, 2002). A formação de um biofilme ocorre em diferentes fases: desencadeado por algum estímulo do ambiente como pH, osmolaridade, temperatura, concentração de O_2, entre outros, ocorre a transição das células planctônicas para biofilme (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Primeiramente ocorre uma fraca adesão das células a uma determinada superfície, em que adesinas específicas são recrutadas e promovem a ligação definitiva dos microrganismos a essa superfície (CROES et al., 2009). Essas adesinas são conhecidas por componentes da superfície microbiana reconhecedora de moléculas adesivas (MSCRAMMS - em inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Podem ser representadas por proteínas ligantes tais como fibronectina, fibrinogênio e colágeno (FOSTER; HÖÖK, 1998).

Após o processo de adesão das células iniciais, seguido do recrutamento de outras células, ou multiplicação celular formando microcolônias, ocorre o amadurecimento e a produção e secreção da matriz de polímero extracelular que envolve o biofilme conferindo proteção e outras vantagens (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A espessura do biofilme pode variar de uma camada de células individuais a uma estrutura complexa de microrganismos envoltos por EPS. Análises estruturais mostram que, em

alguns casos, redes de canais fluem através destas estruturas complexas e permitem o acesso aos nutrientes, mesmo nas camadas mais profundas do biofilme (COSTERTON et al., 1995).

Outro fator determinante para a formação de biofilmes é o fenômeno chamado "*quorum sensing*", que é uma forma de comunicação entre células microbianas, caracterizada pela regulação genética em resposta a densidade celular-populacional. Isso ocorre através da produção, secreção e identificação de auto indutores (moléculas sinalizadoras extracelulares). Ao atingir uma determinada concentração de auto indutores, a expressão do gene alvo é alterada, provocando alteração no comportamento celular microbiano. Como, por exemplo, indução da formação de biofilme. Este fenômeno promove um comportamento coletivo dentro dos biofilmes, proporcionando maior acesso a nutrientes, defesa coletiva contra outros organismos competidores, controle super-populacional e disseminação da infecção para outras regiões (HAMMER; BASSLER, 2003 e SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009).

De acordo com Beveridge et al. (1997), ao adotar este modo de crescimento, incorporado aos biofilmes, os microrganismos beneficiam-se em relação aqueles que crescem de forma planctônica. A matriz polissacarídica extracelular é capaz de sequestrar e concentrar nutrientes ambientais tais como carbono, nitrogênio e fosfato.
Outro benefício do crescimento em biofilmes é a capacidade de evadir de vários mecanismos de defesa, tanto da célula do hospedeiro; como a produção de citocinas e eliminação fagocítica; quanto de mecanismos artificiais - o uso de antimicrobianos, por exemplo (ARCHER et al., 2011). Isto é possível, pois, as células microbianas ficam protegidas pela arquitetura complexa do biofilme, e por isso o sistema imunológico, bem como, os agentes antimicrobianos são incapazes atuar.

A plasticidade metabólica e a expressão de bombas de efluxo de drogas também são fatores que podem explicar a resistência aumentada dos biofilmes aos fármacos. (FANNING; MITCHEL, 2012). Assim como o EPS pode agir como uma barreira à difusão de

antimicrobianos, retardando sua penetração nos microrganismos (XU; STEWART; MCFETERS, 2000). Um estudo conduzido por Singh et al. (2010) mostrou que antibióticos como oxacilina, cefotaxima e vancomicina tiveram sua penetração significativamente reduzida em biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Se o tratamento com antimicrobianos for interrompido, os microrganismos resistentes são capazes de, espontaneamente, sair de um possível estado de latência e produzir uma reativação da infecção (ARCHER et al., 2011).

Por fim, como última vantagem para o microrganismo, no desenvolvimento em biofilmes é o potencial de dispersão no organismo hospedeiro. Microcolônias podem separar-se do biofilme original e migrar para regiões não infectadas do hospedeiro, aderir-se e formar novos biofilmes. Isso ocorre por ação das forças de cisalhamento, ou através de uma resposta geneticamente programada, de um modo semelhante ao que ocorre em uma metástase de células cancerígenas (BOYD; CHAKRABARTY, 1994).

Portanto, biofilmes podem formar ambientes complexos e resistentes à farmacoterapia quando aderidos a próteses, cateteres e sondas, sendo fonte primordial de infecções nosocomiais (STORTI, 2006). Segundo Raad (1998), a grande maioria dos cateteres venosos centrais são colonizados por biofilmes de acordo com estudos feitos com microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Entre as espécies mais frequentemente isoladas nesses cateteres destacam-se *Staphylococcus aureus, Candida albicans, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* (STORTI, 2006).

S. aureus e *C. albicans* estão entre os três patógenos mais comumente isolados da corrente sanguínea, com maior taxa de mortalidade e morbidade em pacientes hospitalizados (PETERS et al., 2010). Estando associados a grande parte das infecções nosocomiais severas, tanto

individualmente, como em interações mutualísticas, sinergéticas e antagonistas que promovem a formação de biofilmes polimicrobianos (ZAGO et al., 2015).

Porém, não são apenas as infecções causadas por cateteres e sondas no ambiente hospitalar que estão relacionadas aos biofilmes. Infecções causadas pelo uso de próteses dentárias, infecções respiratórias e de ouvido, fibrose cística, arteriosclerose, prostatite, úlceras estomacais, entre outras doenças têm essa mesma causa (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Interações entre fungo e bactéria estão relacionadas com uma maior frequência e gravidade das infecções, sendo responsáveis por uma taxa de mortalidade três vezes maior quando comparadas às infecções causadas por microrganismos isolados (FAIX; KOVARIK, 1989).

As endotoxinas, proteínas e outros fatores de virulência produzidos pelos microrganismos são responsáveis por vários efeitos biológicos importantes, como quimiotaxia de células imunológicas e ativação do sistema complemento, indução de febre, hipotensão e choque, coagulação intravascular, ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos não-específicos. Todos esses efeitos são mediados pela produção e secreção de citocinas (OLIVEIRA, 2013).

As células do sistema imune, quando colocadas sob o estímulo das toxinas dos patógenos, liberam diversas citocinas como TNF-α, IL-1β, IL-1, IL-6 e IL-8, bem como, Óxido Nítrico, prostaglandinas, leucotrienos, ciclo-oxigenase e fator ativador de plaquetas (OLIVEIRA, 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. *Staphylococcus aureus:*

O *Staphylococcus aureus* é um coco gram e coagulase positivo e, apesar de ser não-esporulado, pode sobreviver por meses em amostras clínicas secas. É relativamente resistente ao calor e pode tolerar uma alta concentração de sal (ANVISA, 2013).

Microscopicamente é caracterizado por um arranjo espacial em que os cocos se aglomeram em várias dimensões, tomando forma semelhante a cachos de uva. Em grego, *Staphylé,* significa Cacho de Uva. O *S. aureus* pode provocar infecções leves, como espinhas e furúnculos, até infecções graves como, por exemplo, uma pneumonia ou septicemia (SANTOS et al., 2007).

Como microbiota residente, é frequentemente encontrado nas fossas nasais e, ocasionalmente, na pele de pessoas saudáveis. A partir desses sítios, o *S. aureus* pode contaminar membranas mucosas do paciente, objetos inanimados ou outros pacientes por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais devido aos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados (ANVISA, 2013).

Essa capacidade de desenvolver rapidamente resistência a novos agentes antimicrobianos é uma das características mais marcantes das cepas de *S. aureus* (LEITE, 2008). As primeiras cepas resistentes à terapia antimicrobiana surgiram por volta da década de 1930 e, desde então, a cada novo fármaco descoberto para o tratamento de infecções por *S. aureus*, novas cepas resistentes surgem (SANTOS et al., 2007).

Na década de 50 foram relatados os primeiros casos de cepas de *S. aureus* multi-resistentes à tetraciclina e aminoglicosídeos. Em 1960 a meticilina, uma penicilina semi-sintética resistente à β-lactamase e efetiva contra cepas multi-resistentes, foi introduzida à prática clínica (LEITE, 2008). Porém, apenas um ano após seu lançamento, foi isolada a

primeira cepa de *Staphylococcus aureus resistente a Meticilina* (MRSA) (LEITE apud JEVONS, 1961).

Os biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* geralmente, apresentam multicamadas de microcolônias, envoltas em glicocálix composto por proteínas bacterianas e do hospedeiro, ácido teicóico, e um antígeno polissacarídico específico denominado PIA (*polysaccharide intercellular antigen*) (ARCHER et al., 2011).

Após o início da formação do biofilme as adesinas são reguladas negativamente enquanto fatores de evasão do sistema imune e toxinas deletérias ao hospedeiro são reguladas positivamente. Quando o biofilme está completamente maduro, MSSA e MRSA crescem de forma lenta em um ambiente com privação de nutrientes, produzindo menos fatores de virulência e mais sistemas que garantem a homeostase e longevidade do biofilme (RESCH et al., 2006)

O gene responsável pelo PIA, em conjunto com outros genes como sarA (*staphylococcal accessory regulator*), agr (*accessory gene regulator*), eDNA (*extracelular DNA*), ica (*intracelular adhesion)*, entre outros, são necessários e regulam a formação de biofilmes em cepas de MSSA E MRSA (ARCHER et al., 2011). Esses genes também são responsáveis pela expressão de importantes fatores de virulência como a invasão das células do hospedeiro mediada por proteínas ligantes de fibronectina (FnBPs) e a indução de apoptose mediada pela hemolisina α-toxina (HASLINGER-LÖFFLER et al., 2005).

Dentre os metabólitos do biofilme de MSSA, identificou-se maior produção de Aspartil protease secretada (SAP) que está diretamente relacionada com a formação de biofilme e aumento da patogenicidade do mesmo. Uma vez que, essa enzima proteolítica relaciona-se com o aumento da capacidade do microrganismo colonizar e invadir as células do hospedeiro, através da destruição de proteínas. Além disso, SAP produzida pelos biofilmes pode debilitar a defesa imune humoral, através da destruição de anticorpos como as imunoglobulinas (ZAGO

et al., 2015). Outros metabólitos notadamente produzidos por MSSA, como as exotoxinas, proteína A e α-toxina, induzem uma potente resposta inflamatória através da superprodução de citocinas (EZEPCHUK et al., 1996).

2.2. *Candida albicans:*

Candida albicans é um fungo polimórfico, que pode apresentar-se nas formas de levedura unicelular de brotamento, células alongadas com constrições nos septos (pseudo-hifas) e hifas verdadeiras. Durante essa comutação morfológica, C. albicans pode formar glóbulos brancos e opacos, e ainda, clamidósporos, que são estruturas semelhantes a esporos de parede celular espessa (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Comensal da pele e mucosa humana, *C. albicans* está presente na cavidade oral de mais de 75% da população (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Devido a mudanças ambientais e dependendo da competência do sistema imune do hospedeiro pode se tornar patogênica. (HAN et al., 2013 e MATTEI et al., 2013). Os principais tipos de infecção, em seres humanos, causados por *C. albicans* são as infecções superficiais, como a candidíase oral (muito prevalente em imuno-comprometidos) ou vaginal que acomete 75% das mulheres ao menos uma vez na vida (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). E, além dessas, em alguns casos específicos, *C. albicans* pode causar infecções sistêmicas, colocando em risco a sobrevivência do paciente.

Dentre as espécies de Cândida, *C. albicans* é a mais prevalente e a mais patogênica. Essa patogenicidade está relacionada com diferentes fatores de virulência como: aderência, polimorfismo (essencial para adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro), produção de toxinas e enzimas hidrolíticas, composição da parede celular (quitina, glucano, manana, manoproteína e glicolípidos), e a capacidade de formação de biofilmes (HAN et al., 2013; NIEWERTH; KORTING, 2001; ZAGO et al., 2015).

Na formação do biofilme de *C. albicans,* primeiramente ocorre a adesão das leveduras

unicelulares à superfície biótica ou abiótica, em seguida essas células proliferam-se, ocorre a produção de EPS que envolve e protege os fungos, formam-se hifas na parte superior do biofilme e ocorre a dispersão de novas leveduras formadas dentro do biofilme, infectando outras regiões (FINKEL; MITCHELL, 2011). Essa dispersão de leveduras está relacionada com a maior patogenicidade do biofilme, uma vez que essas células recém-formadas são mais virulentas do que aquelas que iniciaram o biofilme (UPPULURI et al., 2010).

Diversos fatores de transcrição como, por exemplo, BCR1, TEC1 e Efg1 NDT80, ROB1 ou Brg1 regulam a formação do biofilme de *C. albicans*, e a deleção de qualquer um deles pode resultar em biofilmes não-funcionais (NOBILE et al., 2012). Além disso, estudos mostram que o Farnesol, um composto de *Quórum sensing* secretado por *C. albicans*, é responsável pela inibição da conversão morfológica entre levedura e micélio, processo fundamental para a formação de biofilme por esse patógeno (RAMAGE et al., 2002).

A expressão de proteases e fosfolipases é outro importante fator de virulência nas infecções por *C. albicans.* A ausência ou diminuição da expressão dessas enzimas acarreta uma diminuição da patogenicidade desse microrganismo. Ainda, isolados clínicos de *C. albicans* provenientes de infecções produziram muito mais fosfolipases extracelulares do que os isolados comensais de mucosas orais (NIEWERTH; KORTING, 2001 e MOHAN; BALLAL, 2008).

Estas enzimas metabolizam fosfolipídios que são um dos principais componentes das membranas biológicas e são responsáveis pela manutenção da estrutura e função de células e organelas de animais, plantas e bactérias (NIEWERTH; KORTING, 2001).

2.3. Biofilmes Polimicrobianos:

Em um biofilme polimicrobiano, diferentes espécies microbianas podem associar-se promovendo interações mutuamente benéficas. A complexa estrutura do biofilme permite a cooperação entre espécies desenvolvendo uma variedade de interações metabólicas, incluindo relações mutualistas e comensais (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009). Como foi visto, microrganismos incorporados aos biofilmes apresentam uma expressão genética diferenciada, e estudos têm sugerido que fenótipos patogênicos amplificados podem surgir devido às interações multiespécies presentes nos biofilmes polimicrobianos (PETERS et al., 2010). Por exemplo, os resultados clínicos de sepse polimicrobiana em comparação com a sepse causada por microrganismos de forma isolada, apresentam taxas de mortalidade significativamente aumentadas (PULIMOOD et al., 2002).

A importância clínica da associação entre espécies microbianas em biofilmes é particularmente significativa quando envolvem espécies prevalentes e com alto potencial patogênico, como *C. albicans e* MSSA. Estes microrganismos são frequentemente co-isolados em uma variedade de doenças agudas e crônicas, tais como queimaduras, pneumonia associada ao uso de respiradores, infecções da corrente sanguínea e aquelas causadas por cateteres e sondas, infecções do trato urinário, e estomatite protética (PETERS et al., 2010).

As infecções que são de natureza polimicrobiana envolvem a adesão de diferentes espécies microbianas às superfícies bióticas ou abióticas, bem como, umas às outras através de interações mutualísticas e comunicação celular através do fenômeno *quórum sensing* (PETERS et al., 2012).

No caso específico do biofilme polimicrobiano de *C. albicans* e MSSA os estafilococos interagem fisicamente tanto com as leveduras quanto com as hifas tendo, aparentemente, tropismo por essas o que garante ao MSSA uma vantagem na invasão de células e tecidos do hospedeiro, já que a hifa é a forma invasiva do fungo. Por outro lado, *C. albicans*

se beneficia ao ter o processo de adesão reforçado ao ser estimulada por proteases produzidas por MSSA (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009 e PETERS et al., 2012).

As proteínas Als e a proteína da parede das hifas (Hwp1) são fundamentais para a adesão de *C. albicans* ao tecido hospedeiro e a outros microrganismos, sendo um importante fator da formação do biofilme polimicrobiano. Especificamente a proteína Als3p parece ser um receptor para MSSA na parede celular de cândida. A deleção do fator de transcrição dessa proteína, gerou diminuição significativa da aderência entre os microrganismos, porém observou-se alguma interação mostrando que outras substâncias podem também estar envolvidas neste processo de adesão, entre elas o próprio EPS dos biofilmes (PETERS et al., 2012).

A associação destes microrganismos resulta, em um biofilme mais forte e com elevada resistência a antimicrobianos. Estudos farmacológicos sugerem que *C. albicans* modula negativamente a ação de agentes antibacterianos e os estafilococos podem diminuir a atividade de agentes antifúngicos nos biofilmes polimicrobianos de MSSA + *C. albicans* (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009; ZAGO et al., 2015).

Animais infectados com *C. albicans* ou *S. aureus*, de forma isolada, apresentaram taxa de sobrevivência de 100% até cinco dias após a inoculação dos microrganismos. Mas, quando esses microrganismos foram co-inoculados, mantendo-se a dose constante, as taxas de sobrevivência caíram para 40% até o segundo dia pós-inoculação (PETERS; NOVERR, 2013). Esses dados mostram o potencial patogênico desses microrganismos quando em sinergismo.

O perfil de expressão de diversas proteínas, enzimas e fatores de transcrição comumente produzidos por MSSA e *C. albicans* isoladamente, quando associados em biofilmes polimicrobianos, foi avaliado e diversos fatores relacionados a virulência desses microrganismos foram regulados positivamente, indicando um fenótipo potencialmente mais patogênico do biofilme polimicrobiano (PETERS et al., 2010).

Os autores evidenciaram, ainda, o fato do gene CodY, repressor de fatores de virulência em cepas de MSSA, ter sido regulado positivamente, quando em biofilmes polimicrobianos de MSSA e *C. albicans.* Indicando não uma imunomodulação do fungo sobre MSSA, porém um mecanismo de evasão do sistema imune presente nos estafilococos, garantindo uma perpetuação da infecção (PETERS et al., 2010).

2.4. Macrófagos e a secreção de citocinas:

Macrófagos são células fagocíticas do sistema imune inato, pertencentes à linhagem mieloide, sendo derivados de uma célula hematopoiética multipotente que se diferencia em monoblasto, pró-monócito e monócito na medula óssea. Em adultos saudáveis, a meia-vida de um monócito circulante é de aproximadamente 70 horas e estas células constituem de um a seis por cento do total de leucócitos do sangue (PADRÃO, 2009 e DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Quando recrutados para o tecido conjuntivo, esses monócitos diferenciam-se em macrófagos e permanecem apenas como residentes, ou são ativados caso haja uma infecção. Os macrófagos são encontrados em todos os tecidos principalmente em órgãos linfoides, fígado, pulmões, trato gastrointestinal, cavidades serosas, ossos, cavidades sinoviais e pele (PADRÃO, 2009). A diferenciação das células multipotentes está associada com a expressão de receptores de membrana específicos para certas citocinas. Este processo envolve, ainda, mudanças fenotípicas como o aumento de cinco a dez vezes no tamanho das células, aumento de organelas tanto em número quanto em complexidade, e o aumento da capacidade fagocítica (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Dentre as principais funções dos macrófagos pode-se listar a fagocitose de microrganismos e partículas estranhas ao hospedeiro, eliminação de células apoptóticas, remoção de excretas do metabolismo dos tecidos e quimiotaxia (recrutamento de células do

sistema imune para a região da infecção, através da liberação de moléculas específicas). Dessa forma, essas células desempenham papel fundamental tanto na resposta inflamatória quanto na homeostasia dos tecidos do hospedeiro (PADRÃO, 2009 e DUQUE; DESCOTEAUX, 2014)

Estudos mostram que os macrófagos expressam em sua superfície mais de 100 tipos de receptores específicos que determinam e controlam suas funções como: diferenciação, crescimento, sobrevivência, adesão, migração, fagocitose, ativação e citotoxicidade. (PADRÃO, 2009).

A habilidade desses receptores para reconhecer uma ampla variedade de ligantes endógenos e exógenos (citocinas, componentes do sistema complemento, imunoglobulinas e moléculas de adesão) e responder apropriadamente é essencial para homeostase do organismo, bem como para a defesa do hospedeiro tanto através da imunidade inata quanto adquirida (PADRÃO, 2009).

Este fato evidencia-se quando ocorre um processo de invasão e os macrófagos atuam não só como a primeira linha de defesa do sistema imunológico, mas também como agentes recrutadores de outros sistemas de eliminação do patógeno. Isso ocorre, entre outros fatores, através dos receptores tipo toll (TLRs) na membrana do macrófago que têm ampla especificidade para diversos componentes dos microrganismos invasores como: lectinas, lipoproteínas, proteínas, enzimas, oligonucleotídeos, polissacarídeos, entre outras moléculas (PADRÃO, 2009 e DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Além dos TLRs, os macrófagos expressam em sua superfície o apresentador de antígeno conhecido como complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Dessa forma, após ter reconhecido e fagocitado o patógeno invasor, o macrófago processa esse microrganismo e os antígenos desse são apresentados através do MHC de classe II aos linfócitos T auxiliares. Esses linfócitos, por sua vez, ativam os linfócitos B através da secreção de citocinas e contato celular. Os linfócitos B ativados liberam anticorpos específicos aos antígenos apresentados

pelos macrófagos. Os anticorpos ligam-se aos antígenos e promovem a opsonização do microrganismo ou das células infectadas, atraindo outros componentes do sistema imune para aquela região e promovendo uma resposta inflamatória mais competente (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Os macrófagos induzem o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de outras células através de citocinas e quimiocinas que além de efeitos locais, também produzem efeitos sistêmicos como febre e resposta inflamatória aguda (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas e secretadas por diversos tipos celulares, como macrófagos e linfócitos. Essas proteínas atuam na comunicação intercelular e na função intracelular regulando processos como a proliferação celular, quimiotaxia, reparação tecidual, e, especialmente, a inflamação local e sistêmica sendo fundamentais para a homeostasia do organismo (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

As citocinas desempenham suas funções através da regulação positiva ou negativa de fatores de transcrição e seus genes correspondentes, ligando-se a receptores específicos na superfície celular gerando uma cascata de sinalização intracelular. Citocinas provocam estímulos antagonistas, sinérgicos ou agonistas nas células e podem ter ação parácrina (em células próximas), autócrina (na própria célula que a secretou) ou, mais raramente, endócrina (que através da corrente sanguínea atinge regiões distantes da célula secretora). As citocinas são essenciais para as funções dos macrófagos e, dependendo da via de ativação celular (clássica ou alternativa), tipos diferentes de citocinas são produzidos e secretados (DINARELLO, 2007 e DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

A resposta inflamatória é benéfica para o hospedeiro quando as citocinas são produzidas em quantidades adequadas. Porém, se produzidas desreguladamente, podem ter um efeito tóxico. Um exemplo é a produção excessiva das citocinas IL-1β e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) que se relacionam com uma resposta inflamatória exacerbada resultando em choque

séptico e falência múltipla de órgãos. Assim como a produção idiossincrática de citocinas resultando em doenças autoimunes (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

O TNF-α é uma citocina que, em resposta a um patógeno invasor, é logo liberada provocando reações agudas da resposta imune, como: febre, vasodilatação e perda da permeabilidade vascular favorecendo a infiltração de linfócitos, neutrófilos e monócitos para o local da infecção. Além disso provoca a perda de apetite e está fortemente relacionada com o choque séptico, evidenciando a importância de sua produção ser bem regulada (BEUTLER, 1999).

A citocina IL-1β também é produzida e liberada nas primeiras fases da resposta imune a um estresse metabólico. É secretada por diversos tipos celulares, majoritariamente monócitos e macrófagos e atua sobre o sistema nervoso central induzindo febre e secreção de prostaglandinas. Em mastócitos induz a liberação de histamina, provocando vasodilatação e inflamação localizada. Essa interleucina atrai granulócitos para a região afetada e regula positivamente a diferenciação de linfócitos T CD4. Por fim, IL-1β aumenta a expressão de moléculas de adesão celular em leucócitos e células endoteliais, e está relacionado com o processo de autofagia que promove a degradação de células anormais ou senescentes e reciclagem de macromoléculas (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

A IL-6 atua tanto de forma pró-inflamatória como anti-inflamatória, dependendo da forma de ativação da célula secretora. As ações regenerativas ou anti-inflamatórias da interleucina-6 são mediadas pela via de sinalização clássica, ao passo que as respostas pró-inflamatórias de IL-6 são mediadas por trans-sinalização (SCHELLER et al., 2011). Esta citocina, promove a produção de proteínas de fase aguda da resposta imune pelo fígado, estimula febre, promove a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, ativa os linfócitos T citotóxicos, e regula a homeostase óssea. IL-6 também leva ao recrutamento de monócitos para o local da inflamação e previne apoptose celular (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Entre as citocinas anti-inflamatórias, pode-se citar a IL-10, produzida e secretada por macrófagos e linfócitos T e B. Dentre suas ações destacam-se a estimulação da produção de imunoglobulinas por linfócitos B e a supressão da produção de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN-γ entre outras citocinas pró-inflamatórias, mostrando a importância dessa citocina na regulação da inflamação (MOSSER; ZHANG, 2008). A IL-10 diminui a ativação e a ação microbicida de macrófagos e impede a apresentação de antígenos por essas células através da supressão da expressão do MHC de classe II (CHADBAN et al., 1998).

O óxido nítrico (NO) é formado através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que atua sobre o aminoácido L-arginina. A NOS pode ser constitutiva (cNOS) que está relacionada a proteção dos vasos sanguíneos e relaxamento vascular, ou induzida (iNOS) em diversas células, principalmente macrófagos e neutrófilos ativados por citocinas como TNF-α e IFN-γ, e outros estímulos pró-inflamatórios (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003 e PADRÃO 2009).

Quando produzido pela iNOS, o NO tem ação citotóxica e citostática capaz de destruir células tumorais e patógenos. Essa ação é causada pela reação de NO com espécies reativas de oxigênio produzidas por células do sistema imune durante processos infecciosos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

3. OBJETIVO:

Avaliar o efeito dos metabólitos produzidos por biofilmes de *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* suscetível a Meticilina (MSSA) e pelo biofilme polimicrobiano (*C. albicans* + MSSA), em macrófagos J774A.1, através da dosagem de citocinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

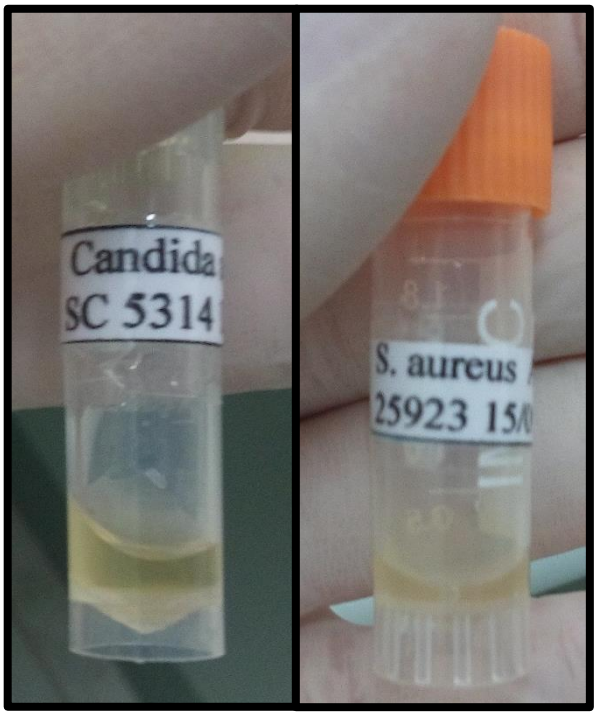
4.1. Microrganismos e condições de armazenamento:

Foram utilizados os seguintes microrganismos de referência: *C. albicans* SC5314, um isolado clínico humano proveniente da "*Spanish Collection*" e *Staphylococcus aureus* suscetível à Meticilina (MSSA) ATCC25923, obtido da "*American Type Culture Collection*".

Os microrganismos foram mantidos congelados a -70°C, em tubo criogênico contendo meio de cultura apropriado e glicerol, até o momento de sua utilização (Figura 1).

Meio Y*east Extract Peptone Dextrose* (YEPD – 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% D-glucose, 2% Ágar – DIFCO, Becton Dickinson Sparks, MD, EUA) para a cepa de *C. albicans*, e meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB- Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, EUA) para a cepa de MSSA.

Figura 1: Tubos criogênicos contendo as Cepas *Candida albicans* SC5314 e *Staphylococcus aureus* suscetível à Meticilina (MSSA) ATCC25923



Fonte: Virgínia Barreto Lordello, acervo pessoal.

4.2. Reativação e condições de cultivo dos microrganismos:

Previamente à sua utilização, as cepas foram descongeladas e os microrganismos foram semeados em Placas de Petri (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça) contendo meios de cultura específico: uma alçada (10µl) de *C. albicans* foi semeada em placas contendo *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA – Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, EUA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (0,1 g/L). E uma alçada (10µl) de MSSA foi semeada no meio *Brain Heart Infusion* (BHI- Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, EUA) suplementado com o antifúngico anfotericina B (0,025 g/L).

Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 37ºC, por 48 horas (Estufa bacteriológica, Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).

4.3. Obtenção das soluções de inóculo:

Após o período de incubação, os microrganismos recém cultivados foram inoculados em meios de cultura ricos em nutrientes (caldos), para obtenção das soluções de pré-inóculo. Para isso, sete colônias de MSSA foram transferidas da placa de Petri para tubos estéreis contendo 10 mL de caldo TSB, em triplicata. Os tubos foram mantidos em estufa a 37ºC, por 18 horas.

Para *C. albicans,* dez colônias recém-cultivadas foram transferidas para tubos estéreis contendo 10 mL caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB - Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, EUA) suplementado com 100 mM de glicose, também em triplicata. Os tubos foram mantidos em estufa a 37ºC, durante 16 horas.

Após o período de incubação das soluções de pré-inóculo de MSSA e *C. albicans,* 18 e 16 horas respectivamente, descartou-se possíveis contaminações dessas soluções com auxílio de um microscópio de bancada, e procedeu-se as diluições necessárias para obter-se as soluções de inóculo.

Para obtenção do inóculo de MSSA foi realizada uma diluição na razão de 1:20 (1 mL da solução de pré-inóculo em 19 mL de caldo TSB), em triplicata. Os três tubos foram então incubados a 37ºC por aproximadamente 4h, ou até atingirem o meio da fase exponencial evidenciado pela densidade óptica (DO) 600nm= 0.597±0.019, que corresponde a $2.35x10^8$ ± $1.70x10^8$ UFC/mL.

Para a cultura de *C. albicans* a diluição do pré-inóculo foi realizada na razão de 1:10 (2 mL da solução de pré-inóculo em 18 mL de caldo YNB suplementado com glicose), em triplicata. Então, os três tubos foram incubados a 37ºC por aproximadamente 9h, ou até atingirem o meio da fase exponencial evidenciado pela DO 540nm= 0,557 ± 0,148 que corresponde à $5.20x10^6$ ± $9.47x10^5$ UFC/mL.

Dentre os três tubos incubados, para cada espécie, aqueles cuja solução de inóculo apresentou densidade óptica mais próxima ao meio da fase exponencial da curva de crescimento de MSSA e *C. albicans*, respectivamente, foram escolhidos para prosseguir o experimento.

As soluções escolhidas foram homogeneizadas no agitador tipo vórtex e, então, as culturas microbianas foram centrifugadas a 3.220 xg por 10 minutos, a 4ºC e os precipitados celulares foram lavados com tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered salin*e (PBS; NaCl 100 mM, NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,2 - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil) por meio de agitação e centrifugação. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em meio de cultura líquido RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), tamponado com MOPS 34,32g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a pH 7.0; e as densidades ópticas das suspensões foram padronizadas à concentração de $1x10^7$ UFC/mL para ambos os microrganismos.

4.4. Formação dos Biofilmes:

Para iniciar o processo de formação dos biofilmes, transferiu-se a suspensão de cada microrganismo contendo $1x10^7$ UFC/mL para diferentes placas de cultura estéreis de 24 poços (TPP- Techno Plastic Products AG, Suíça), seguindo a metodologia proposta por Pereira et al. (2010).

Para a formação do biofilme isolado de MSSA foi preparada uma solução contendo 750 µl da suspensão de MSSA ($1x10^7$ UFC/mL) + 750 µl de meio RPMI em oito poços da placa de cultura pré-estéril, totalizando 1500 µL de solução por poço. O mesmo procedimento foi realizado para os testes com culturas isoladas de *C. albicans,* em uma placa de cultura distinta, para evitar-se contaminação cruzada. Em uma terceira placa de cultura, formou-se o biofilme polimicrobiano. Preparou-se também uma solução final de 1500 µL/poço, porém, neste caso, a solução era composta por 750 µl da suspensão de cada um dos microrganismos: (750 µl *C. albicans* + 750 µl MSSA).

Para que ocorresse a adesão dos microrganismos ao fundo e paredes dos poços, todas as placas foram incubadas por 90 minutos a 37ºC sob agitação orbital de 75 rpm. Garantindo que as células menos aptas não fiquem aderidas (CHANDRA et al., 2001).

Após a fase de adesão, retirou-se todo líquido de cada um dos poços e esses foram lavados, cuidadosamente, duas vezes, com 1500 µL de PBS estéril para remoção das células não aderidas, tamponamento do meio e remoção de metabólitos indesejados. Em seguida, foram adicionados 1500 µL de meio de cultura fresco (RPMI-1640) em cada poço contendo microrganismos aderidos e então as placas foram recolocadas no agitador orbital, para dar continuidade à formação dos biofilmes.

Após 24 horas, renovou-se o meio de cultura (RPMI-1640) dos poços contendo biofilmes, e então as três placas foram colocadas no agitador orbital a 37ºC e 75 rpm por mais 12 horas, totalizando 36 horas de formação dos biofilmes.

4.5. Caracterização dos biofilmes: quantificação de microrganismos e determinação de pH:

Com os biofilmes formados (MSSA, *C. albicans* e polimicrobiano) em três dos poços da placa de cultura estéril (triplicata) foi feito o plaqueamento para quantificar-se os microrganismos nos três biofilmes, da seguinte maneira:

Aspirou-se o RPMI (sobrenadante) dos poços, cuidadosamente, para evitar a retirada dos biofilmes aderidos e mensurou-se o pH desses sobrenadantes. Os poços contendo apenas os biofilmes aderidos foram então lavados, duas vezes, com 1500µl de PBS para remoção de microrganismos não aderidos. Em seguida, os biofilmes foram ressuspendidos e homogeneizados em 100µl de PBS através da raspagem do fundo e borda dos poços com auxílio de uma pipeta, por um minuto.

As suspensões obtidas foram diluídas em série com PBS (até 10^{-5} para *C. albicans* e até 10^{-6} para MSSA) e, então, foram plaqueadas em placas de Petri contendo meios de cultura específicos. O biofilme de *C. albicans* foi plaqueado em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) suplementado com cloranfenicol (0,1 g/L), o biofilme de MSSA foi plaqueado em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com anfotericina B (0,025 g/L).

O biofilme polimicrobiano foi plaqueado em ambos meios de cultura. As placas de Petri foram devidamente identificadas e incubadas durante 48h a 37°C. Os valores de UFC /ml foram manualmente contados. Essa caracterização foi realizada em triplicata e em três datas distintas (n=9 amostras).

4.6. Cultura Celular:

Os macrófagos J774A.1 (BCRJ 0121) foram adquiridos do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), e foram cultivados em meio de cultura *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium* (DMEM - GIBCO, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 UI/mL e 100 mg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). As células foram mantidas em incubadora de CO_2 a 5%, à temperatura de 37°C e 80% de umidade.

As células foram cultivadas até atingirem 90% de confluência, foram lavadas com PBS, retiradas das placas de cultura com auxílio de um *scraper* e então submetidas a centrifugação a 200 x*g* por cinco minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placa de cultura de 24 poços, na proporção de $1{,}0x10^5$ células/poço. As células foram incubadas *overnight* antes da realização dos experimentos. Para os experimentos foram usadas células entre a 3ª e 8ª passagem.

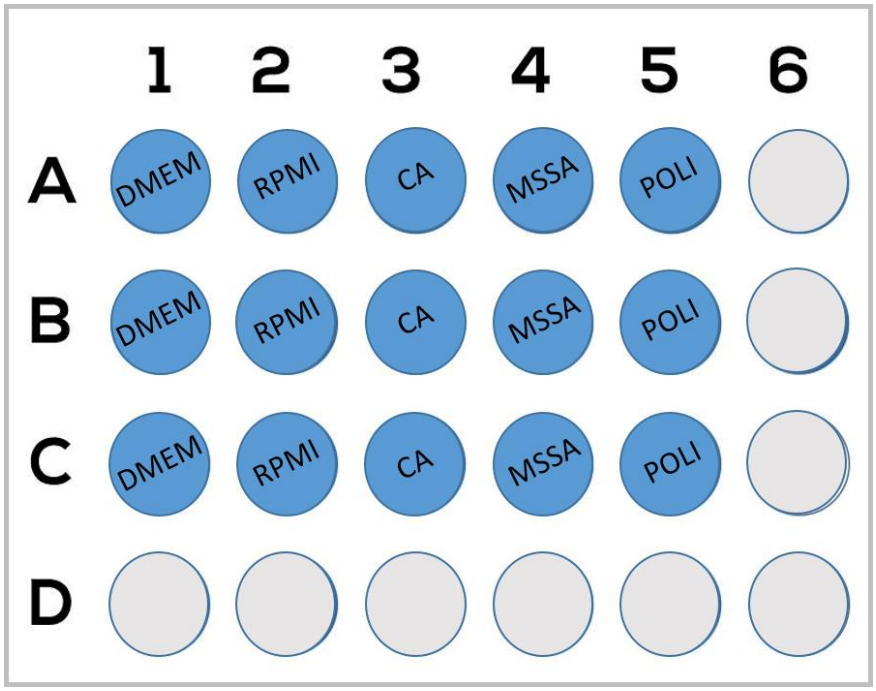
4.7. Estimulação dos Macrófagos J774A.1 com filtrado dos biofilmes de *C. albicans*, MSSA e do biofilme polimicrobiano:

Após as 36 horas de formação dos biofilmes de *C. albicans*, MSSA e do biofilme polimicrobiano, os sobrenadantes e os microrganismos aderidos a cinco poços foram removidos das placas de cultura e processados para a obtenção das soluções contendo os metabólitos produzidos por cada biofilme. Essas soluções foram centrifugadas e o sobrenadante obtido foi filtrado em filtro de baixa ligação proteica SFCA de 0,22 µm (Corning, Alemanha), para evitar que outros componentes dos biofilmes (células ou organelas), além das toxinas e metabólitos produzidos fossem colocados em contato com os macrófagos J774A.1.

Previamente à estimulação da cultura celular de J774A.1 com as soluções processadas e filtradas dos biofilmes, foi realizada a diluição desses na concentração de 1:4 em meio de cultura DMEM. Além do estímulo com a solução filtrada e diluída dos biofilmes, as células J774A.1 também ficaram em contato, por 24 horas, com os meios de cultura DMEM (meio de cultura dos macrófagos) e RPMI-1640 (meio de cultura dos biofilmes), como mostra a Figura 2.

O RPMI também foi diluído em DMEM na proporção 1:4, e ambos meios de cultura foram utilizados como controles negativos. A placa de cultura foi mantida, por 24 horas, em incubadora de CO_2 a 5%, à temperatura de 37°C e 80% de umidade.

Figura 2: Desenho Experimental do Estímulo dos Macrófagos J774A.1 com os cinco grupos experimentais.

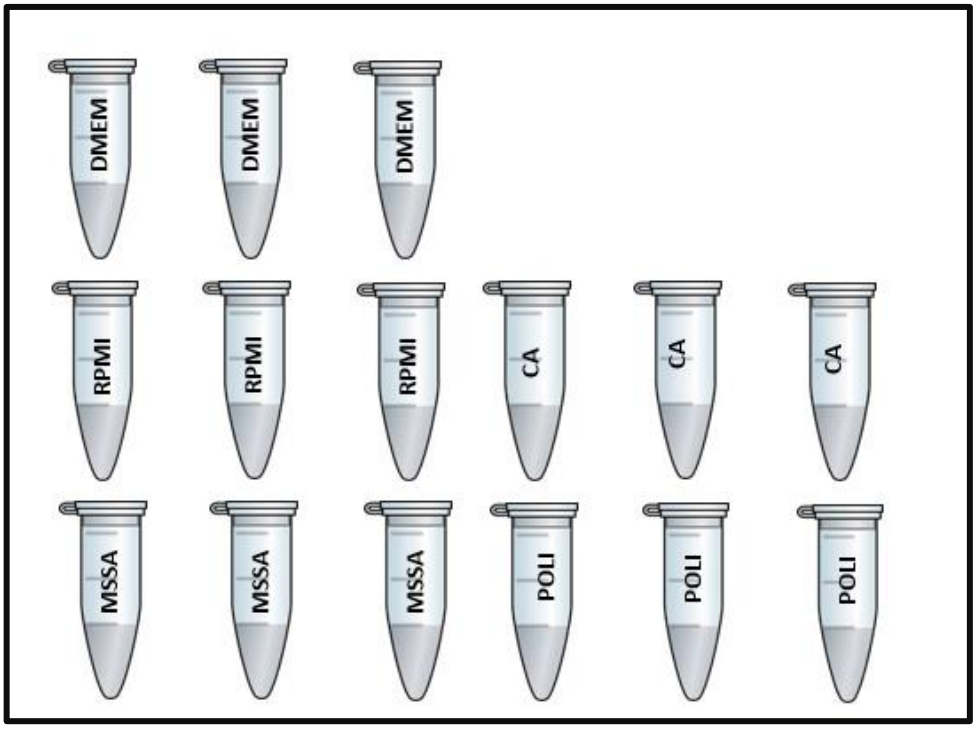


Para cada um dos cinco grupos experimentais (**MSSA**- solução filtrada e diluída do biofilme de MSSA; **CA**- solução filtrada e diluída do biofilme de *C. albicans;* **POLI** – solução filtrada e diluída do biofilme polimicrobiano MSSA+*C. albicans;* **RPMI** - controle e **DMEM**- controle), as células foram estimuladas em triplicata (três orifícios da placa de cultura). Fonte: Virgínia Barreto Lordello.

Após o período de estímulo, retirou-se uma alíquota (500µl) do sobrenadante da cultura celular estimulada por cada um dos cinco grupos experimentais e essas alíquotas foram imediatamente congeladas a -20ºC até a realização da dosagem de citocinas produzidas (Figura 3). Ao todo, foram realizados quatro experimentos em diferentes datas, desde a reativação dos microrganismos congelados, formação dos biofilmes e estímulo das células J774.A1. Dessa forma, para a dosagem das citocinas, obteve-se o total de 15 amostras com 500µl cada, por experimento. Totalizando sessenta amostras.

Com as células estimuladas por 24 horas, realizou-se o teste de viabilidade celular (MTT) para assegurar a viabilidade celular dos macrófagos J774.A1, previamente à dosagem das citocinas produzidas por eles.

Figura 3: Esquema de armazenamento do sobrenadante da cultura celular estimulada pelos cinco grupos experimentais.



Em cada microtubo armazenou-se 500µl do sobrenadante da cultura de J774A.1 estimulada com os cinco grupos experimentais. Congelou-se a -20°C até a dosagem das citocinas produzidas.
Fonte: Virginia Barreto Lordello

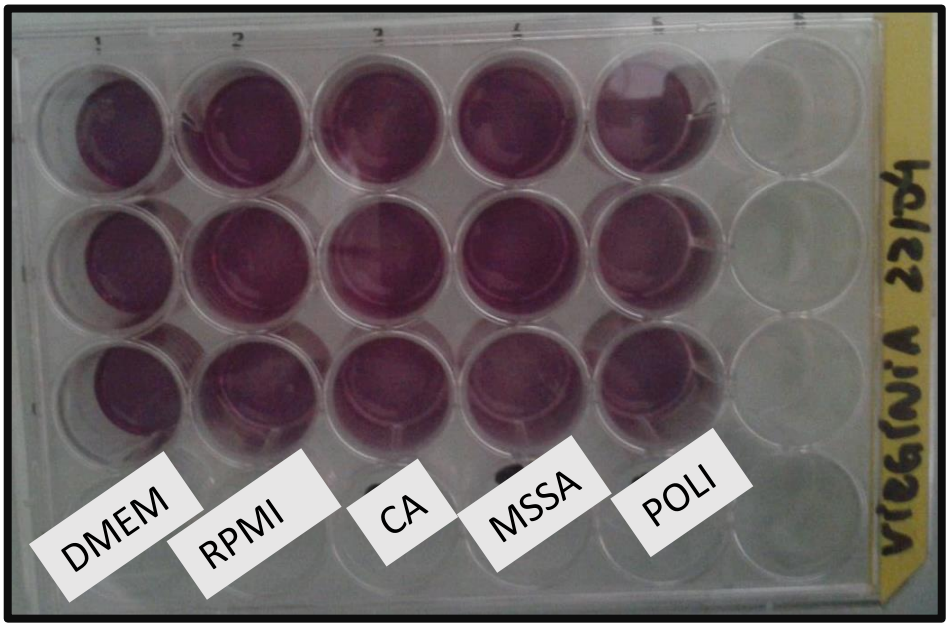
4.8. Ensaio de viabilidade celular – MTT:

O ensaio colorimétrico com o sal tetrazólio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio brometo] (Sigma-Aldrich) consiste na avaliação da viabilidade celular indicada pela clivagem do sal MTT (amarelo e solúvel em H_2O) em um sal de formazan (roxo e insolúvel em H_2O) que pode ser quantificado através de espectrofotometria. Essa bio-redução do MTT é realizada durante a cadeia respiratória e está relacionada com a produção de espécies redutoras, por mitocôndrias competentes de células metabolicamente ativas. Dessa forma, a quantidade de cristais de formazan formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura celular (MOSMANN, 1983; VISTICA et al., 1991).

Para determinar a viabilidade celular das células estimuladas, após a retirada e armazenamento dos sobrenadantes (como descrito no item 4.7.), os macrófagos J774.A1 foram lavados com PBS e incubados, por quatro horas, com 250 μL de uma solução de MTT em PBS na concentração de 2,5 mg/mL. Após as quatro horas, retirou-se o MTT dos poços e o produto colorimétrico formado foi solubilizado em 250 μL de isopropanol (Figura 4).

Os resultados foram detectados em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 562 nm (Reader 400 EZ – Biochrom, Cambridge, Reino Unido), onde os valores de absorbância foram considerados como indicadores de viabilidade celular. Não houve interferência do meio de cultura dos biofilmes (RPMI) na viabilidade celular. Os parâmetros de avaliação observados foram a porcentagem de células viáveis em função do controle DMEM.

Figura 4: Ensaio de viabilidade celular (MTT) dos Macrófagos J774A.1 estimulados com os cinco grupos experimentais.



Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 quando estimulados com: **DMEM**- Meio de cultura dos Macrófagos J774A.1; **RPMI**- Meio de cultura dos biofilmes diluído em DMEM (controle); **MSSA**-solução filtrada e diluída do biofilme de MSSA; **CA**- solução filtrada e diluída do biofilme de *C. albicans;* **POLI** - solução filtrada e diluída do biofilme polimicrobiano MSSA+*C. albicans*, Fonte: Virgínia Barreto Lordello, acervo pessoal.

4.9. Dosagem de citocinas produzidas pelos macrófagos J774A.1:

A produção de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α) provenientes de culturas isoladas e polimicrobianas de MSSA e *C. albicans* em macrófagos J774A.1 foi analisada por meio do Ensaio de Imunoadsorção Enzimática – ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Citocinas no sobrenadante da cultura celular foram detectadas em pg/mL.

Para a realização do teste de ELISA, 100 μL dos anticorpos de captura específicos (anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6 e anti-IL-10) foram colocados em cada orifício das placas de microtitulação de 96 poços. As placas foram cuidadosamente embaladas e incubadas *overnight* a 4ºC.

Após esse período de sensibilização das placas com os anticorpos de captura, essas foram lavadas, três vezes, com 300 μL de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) em uma lavadora automática de placas (ELx50 - BioTek Instruments, Inc., baseada em Winooski, VT, EUA). As placas foram cuidadosamente invertidas sobre um papel absorvente para remoção de qualquer resíduo da lavagem.

Então, as placas foram bloqueadas com o diluente de ensaio (PBS acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino) e mantidas em temperatura ambiente por uma hora e, em seguida, foram lavadas seguindo o mesmo procedimento descrito acima.

As curvas-padrão para cada citocina avaliada, bem como, as amostras analisadas foram preparadas e/ou diluídas com o diluente de ensaio na seguinte proporção: (Il-6 1:4; TNF-α 1:10; IL-1β 1:5, 1:2 e sem diluição; Il-10 1:4) Então, 100 μL do padrão de citocinas (curva-padrão) ou 100 μL das amostras (sobrenadantes da cultura celular de J774A.1 estimulada com cada um dos cinco grupos experimentais) foram adicionados nos orifícios das placas de 96 poços, de acordo com o desenho experimental (Figura 5). As placas foram embaladas e mantidas, por duas horas sobre a bancada, em temperatura ambiente.

Transcorrido esse tempo, as placas foram aspiradas e lavadas cinco vezes na lavadora automática de placas. Então, foi adicionado a cada poço das placas 100 μL dos anticorpos de detecção específicos para anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6 e anti-IL-10, marcados com estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. As placas foram incubadas por mais uma hora em temperatura ambiente.

Novas sete lavagens foram realizadas, sendo que, nessas os orifícios ficaram embebidos do tampão de lavagem, entre um ciclo e outro, por 30 segundos. Após essa lavagem final adicionou-se, a cada orifício, 100 μL da solução de substrato, composto por peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina na proporção de 1:1. As placas foram abrigadas da luz com papel alumínio, e permaneceram à temperatura ambiente por 30 minutos.

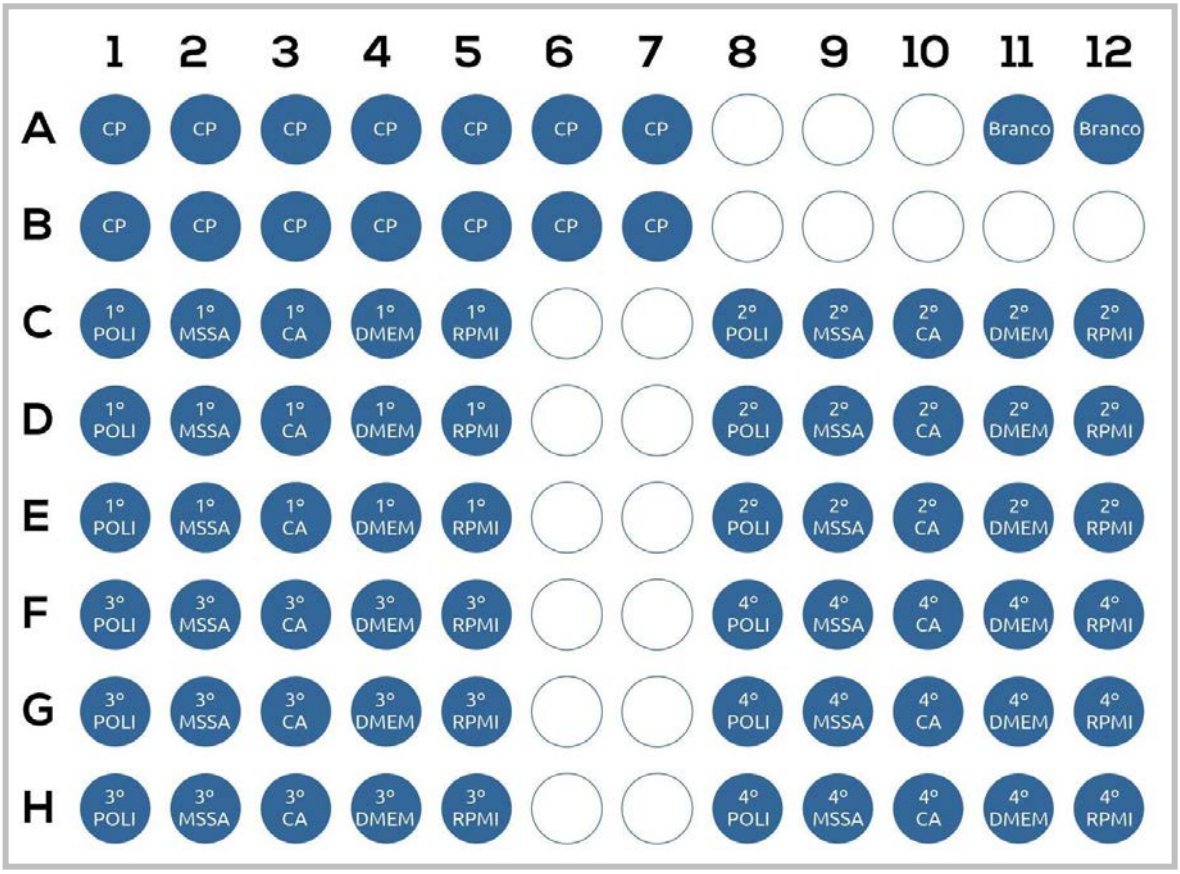
Passado o tempo de reação, 50 μL da solução de parada da reação (ácido sulfúrico 2N) foram adicionados a cada orifício. As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas (Epoch™ - BioTek Instruments, Inc., baseada em Winooski, VT, EUA), no qual a absorbância foi lida com comprimento de onda de 450 nm.

A produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada pelo método colorimétrico de Griess (GREEN et al., 1982). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida e 0.1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato em ácido ortofosfórico (H_3PO_4) a 5%, preparada no momento da realização do ensaio que ao reagir com NO presente na amostra, gera um composto de coloração rosa-avermelhada, que pode ser quantificado.

As amostras (100μl de cada grupo experimental) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços conforme desenho experimental (Figura 5) acrescidas de 100μl do reagente de Griess recém preparado. A curva-padrão continha 11 pontos (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 e 0,19 μM) sendo o décimo segundo ponto o branco (0 μM).

Após dez minutos, as placas foram levadas ao leitor de microplacas (Epoch™ - BioTek Instruments, Inc., baseada em Winooski, VT, EUA), no qual a absorbância foi lida com comprimento de onda de 540 nm.

Figura 5: Desenho experimental dos testes de detecção de citocinas produzidas por macrófagos J774A.1 após estimulo por 24 horas com os cinco grupos experimentais.



CP: curva-padrão de citocinas; **POLI**: sobrenadante da cultura celular estimulada com o filtrado do biofilme polimicrobiano; **MSSA:** sobrenadante da cultura celular estimulada com o filtrado do biofilme de MSSA; **CA:** sobrenadante da cultura celular estimulada com o filtrado do biofilme de *C. albicans;* **DMEM:** sobrenadante da cultura celular estimulada com o meio de cultura DMEM; **RPMI:** sobrenadante da cultura celular estimulada com o meio de cultura RPMI. **1º,2º,3º e 4º** referem-se aos quatro experimentos realizados em datas distintas. **Fonte:** Virgínia Barreto Lordello.

4.10. Análise Estatística:

A avaliação estatística das variáveis de $\log_{10}$ UFC/mL e da produção de citocinas foi feita por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Um nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos realizados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três, ou mais, ocasiões independentes.

5. RESULTADOS:

5.1. Caracterização dos biofilmes:

5.1.1. *Quantificação de microrganismos nos biofilmes:*

A Tabela 1 mostra que houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou os valores de $\log_{10}$ UFC/mL para os biofilmes de MSSA, com 36 horas de formação, em culturas simples e polimicrobianas. O que não ocorreu quando se comparou os biofilmes simples e polimicrobianos de *C. albicans*.

Tabela 1- Valores de média, desvio padrão, intervalo de confiança, valor mínimo e máximo de $\log_{10}$ UFC/mL para o crescimento de *C. albicans* e MSSA em biofilmes simples e polimicrobianos com 36 horas de formação em três ocasiões distintas realizadas em triplicata (n= 9 amostras).

UFC			**IC (95%)**				
Grupo	Média	DP	LI	LS	Mínimo	Máximo	*p**
Ca[a]	5,75	0,18	5,61	5,89	5,46	5,99	
MSSA[b]	7,85	0,03	7,82	7,88	7,78	7,91	>0,05
POLI (Ca)[a]	5,84	0,06	5,79	5,90	5,75	5,95	
POLI (MSSA)[c]	8,39	0,18	8,25	8,53	8,04	8,68	

* ANOVA. Pós-teste de Tukey = letras iguais para resultados sem diferença significativa; letras diferentes para resultados com diferença significativa. LI: limite inferior; LS: limite superior.

5.1.2. *Caracterização dos biofilmes: pH*

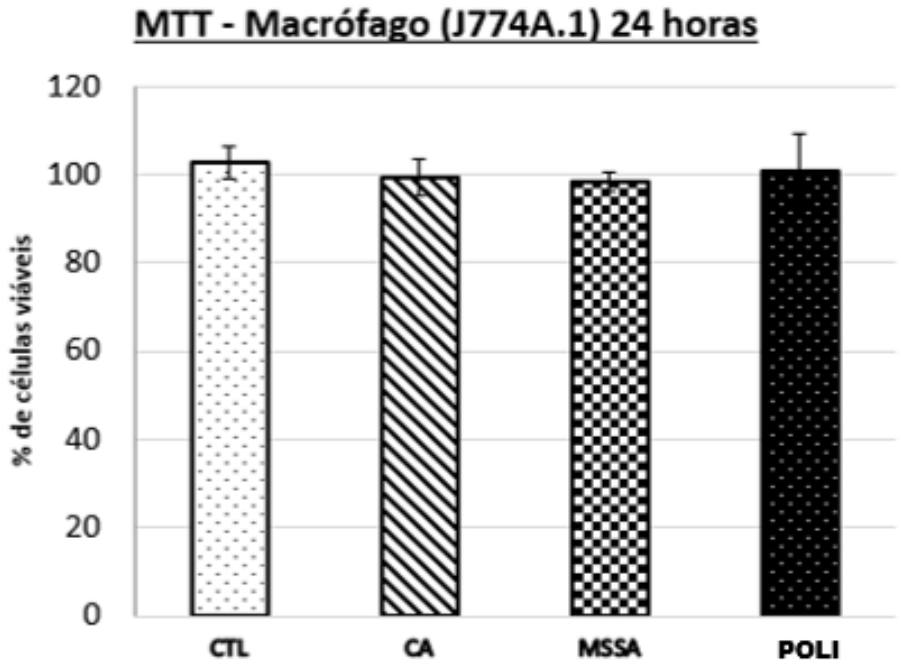
O pH do sobrenadante dos biofilmes de *C. albicans* (pH= 7,03), MSSA (pH= 6,89) e polimicrobiano (pH = 7,00) manteve-se próximo ao pH fisiológico (7,0), mostrando que os valores do pH não interferiram nas taxas de viabilidade celular.

5.2. Ensaio de viabilidade celular (MTT):

Não ocorreu diferença estatística significativa entre os grupos experimentais e em relação ao controle (RPMI), quando os macrófagos J774.A1 foram estimulados por 24 horas com o filtrado dos biofilmes, diluído na proporção de 1:4 em meio de cultura DMEM. Essa diluição fez-se necessária pois, em experimentos anteriores, utilizando os filtrados sem diluição, obteve-se baixíssima viabilidade celular dos macrófagos. Inviabilizando, desse modo, a dosagem de citocinas produzidas pelos macrófagos estimulados e a conclusão do experimento.

Dessa forma, os macrófagos foram estimulados, por 24 horas, com a diluição do filtrado de cada biofilme, e de RPMI-1640 em DMEM, na proporção 1:4, garantindo a viabilidade celular ≥ 95%.

Gráfico 1. Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 estimulados por 24h



CTL: meio de cultura RPMI; **CA:** filtrado do sobrenadante do biofilme de *C. albicans;* **MSSA:** filtrado do sobrenadante do biofilme de MSSA**; POLI:** filtrado do sobrenadante do biofilme polimicrobiano**.** De três experimentos distintos realizados em triplicata (n=9 amostras).

5.3. Dosagem de citocinas produzidas pelos macrófagos J774A.1

A análise dos resultados obtidos mostrou que houve maior produção de NO, IL-6 e TNF-α nos macrófagos estimulados com os metabólitos do biofilme de MSSA em comparação com aqueles estimulados com os metabólitos do biofilme de *C. albicans.* Para o grupo estimulado por *C. albicans* os níveis de produção de citocinas foram baixos ou não detectados em todos os testes realizados, com exceção de NO. No caso das células estimuladas por metabólitos do biofilme polimicrobiano, a produção de TNF-α foi equivalente à do grupo MSSA e a produção de NO e IL-6 por J774.A1 foi menor.

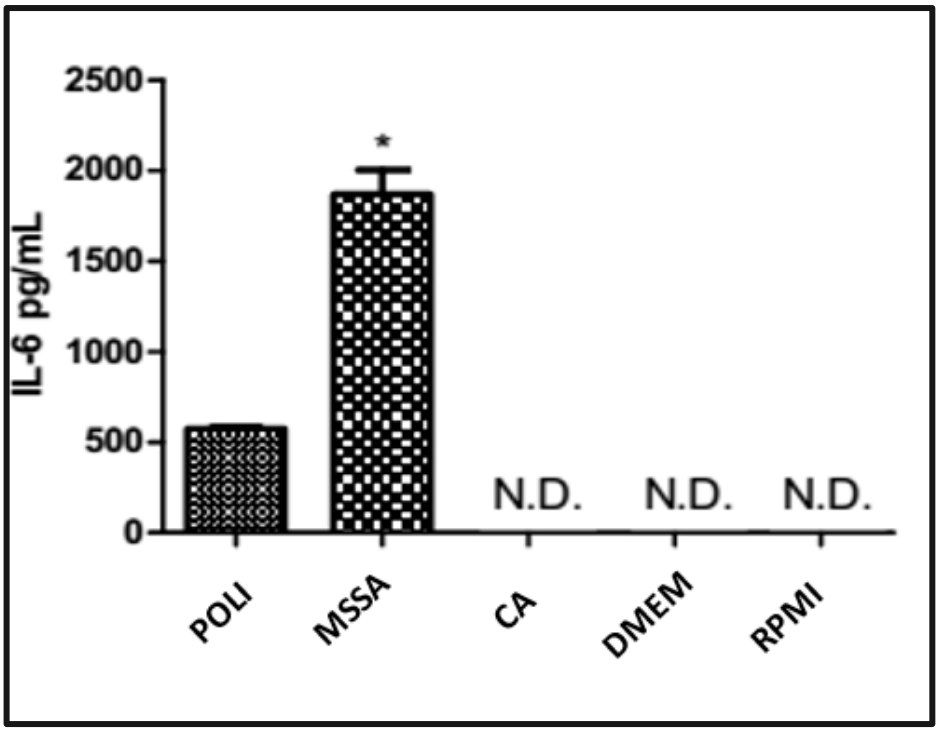
5.3.1. *Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 1β (IL-1β)*

Não foi detectada a produção destas citocinas em nenhuma das tentativas de diluição e em nenhum dos quatro experimentos realizados. Indicando que os metabólitos oriundos dos biofilmes de *C. albicans,* MSSA e polimicrobiano não promovem a liberação de IL-10 e IL-1β por macrófagos J774.A1, através da metodologia de ELISA.

5.3.2. *Interleucina 6 (IL-6):*

A produção da citocina IL-6 foi detectada nos sobrenadantes da cultura celular estimulada pelos metabólitos dos biofilmes de MSSA e do biofilme polimicrobiano, com diferença estatística significativa entre esses grupos. Não houve produção dessa citocina quando os macrófagos foram estimulados com os metabólitos do biofilme de *C. albicans.*

Gráfico 2: Produção de IL-6 por macrófagos J774.A1 estimulados por 24h

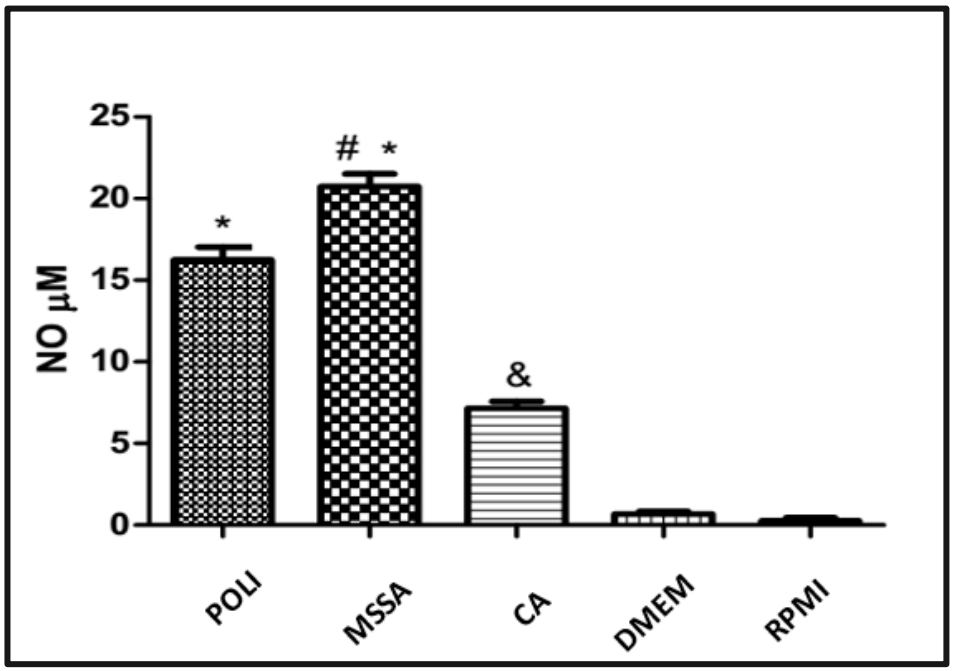


Produção de IL-6 quando os macrófagos foram estimulados com: MSSA: filtrado do biofilme de MSSA; **CA**: filtrado do biofilme de *C. albicans***, POLI:** filtrado do biofilme polimicrobiano; **DMEM** e **RPMI** (meios de cultura /controles). As barras de erro representam o desvio padrão entre os experimentos e os símbolos representam a diferença estatística entre os grupos. * *versus* POLI. ANOVA pós teste de Tukey, $p \geq 0,05$.

5.3.3. *Óxido Nítrico (NO):*

A produção de óxido nítrico (NO) foi detectada nos sobrenadantes da cultura celular estimulada por todos os grupos experimentais. Houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os macrófagos estimulados por metabólitos do biofilme polimicrobiano e de MSSA produziram mais oxido nítrico quando comparados aos estimulados por metabólitos de *C. albicans*, DMEM e RPMI. O grupo estimulado por metabólitos de MSSA produziu mais óxido nítrico do que o estimulado pelos metabólitos do biofilme polimicrobiano. A estimulação com metabólitos de *C. albicans* gerou maior produção de NO do que os controles DMEM e RPMI.

Gráfico 3: Produção de NO por macrófagos J774.A1 estimulados por 24h.

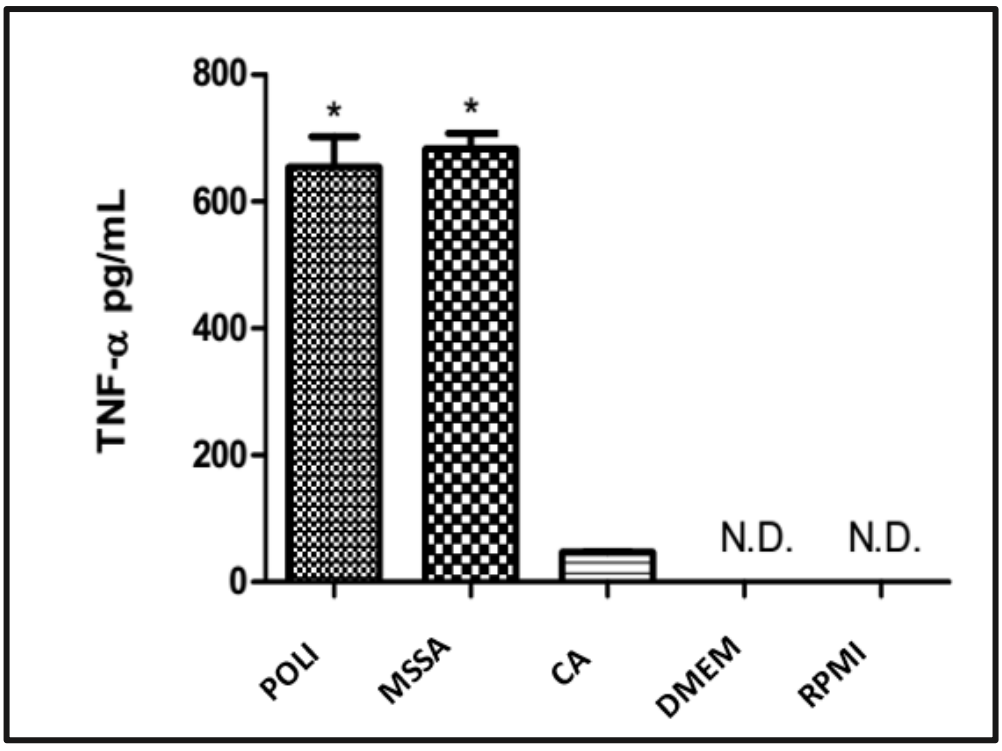


Produção de NO quando os macrófagos foram estimulados com: MSSA: filtrado do biofilme de MSSA; **CA**: filtrado do biofilme de *C. albicans,* **POLI:** filtrado do biofilme polimicrobiano; **DMEM** e **RPMI** (meios de cultura /controles). As barras de erro representam o desvio padrão entre os experimentos e os símbolos representam a diferença estatística entre os grupos. * *versus* CA, DMEM e RPMI; # *versus* POLI; & *versus* DMEM E RPMI. ANOVA pós teste de Tukey, $p \geq 0,05$.

5.3.4. *Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α):*

A produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) foi detectada nos sobrenadantes da cultura celular estimulada pelos metabólitos dos biofilmes de *C. albicans*, MSSA e do biofilme polimicrobiano. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos estimulados por metabólitos do biofilme de MSSA e polimicrobiano, porém, houve quando estes dois foram comparados ao grupo estimulado por metabólitos de *C. albicans*.

Gráfico 4: Produção de TNF-α por macrófagos J774.A1 estimulados por 24h



Produção de TNF- α quando os macrófagos foram estimulados com: MSSA: filtrado do biofilme de MSSA; **CA**: filtrado do biofilme de *C. albicans*, **POLI:** filtrado do biofilme polimicrobiano; **DMEM** e **RPMI** (meios de cultura /controles). As barras de erro representam o desvio padrão entre os experimentos e os símbolos representam a diferença estatística entre os grupos. * *versus C. albicans.* ANOVA pós teste de Tukey, $p \geq 0,05$.

6. DISCUSSÃO:

Este trabalho de conclusão de curso investigou os efeitos de metabólitos solúveis produzidos por biofilmes isolados e polimicrobianos de *C. albicans* e MSSA em macrófagos J774A.1, *in vitro*.

Quando os macrófagos foram estimulados com metabólitos do biofilme de *C. albicans*, a produção de citocinas foi baixa (NO, TNF- α) ou nula (IL-6). Como pode ser visto no ANEXO A deste trabalho (ZAGO et al., 2015), entre os metabólitos produzidos pelos biofilmes aqui avaliados, a produção de Aspartil protease secretada (SAP) nos biofilmes de MSSA e no biofilme polimicrobiano foi significativa, porém, no biofilme de *C. albicans* foram detectados níveis consideravelmente baixos dessa enzima.

O SAP é um forte indutor da produção de citocinas pró inflamatórias como IL-6 e TNF-α (PIETRELLA et al., 2010), o que em conjunto com os resultados obtidos por Zago et al. (2015) pode explicar a produção elevada dessas citocinas quando os macrófagos J774A.1 foram estimulados pelos metabólitos do biofilme de MSSA e do biofilme polimicrobiano, bem como, a baixíssima produção de TNF-α e não produção de IL-6 quando os macrófagos foram estimulados com metabólitos do biofilme de *C. albicans.*

O estímulo de células do sistema imune com as exotoxinas, proteína A, α-toxina e outros metabólitos de MSSA, induz uma superprodução de citocinas. (EZEPCHUK et al., 1996). Este fato suporta os resultados obtidos, nos quais observou-se altos níveis de produção de IL-6, TNF-α e NO pelos macrófagos J774A.1 estimulados com metabólitos do biofilme MSSA.

A presença de NO nas culturas celulares estimuladas pelos controles DMEM e RPMI pode estar relacionada com a alta concentração do aminoácido L-arginina na composição destes meios de cultura. Uma vez que a síntese de NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios da L-arginina por ação da enzima NO-sintase, sendo aquele aminoácido essencial para essa síntese (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Também foi demonstrado por Zago et al. (2015) que nos biofilmes de *C. albicans* há maior produção de fosfolipase C (PL-C), se comparado aos demais biofilmes.

A produção de intermediários reativos de nitrogênio, dentre eles o NO, é uma via clássica de resposta do hospedeiro às infecções por *C. albicans e* pode estar relacionado, entre outros fatores, à secreção de fosfolipases e lipases por este microrganismo (PARAJE et al., 2009).

Apesar disso, observou-se considerável menor produção de NO quando os macrófagos foram estimulados por metabólitos do biofilme de *C. albicans* do que quando as células foram estimuladas por metabólitos dos outros biofilmes. Este resultado está em concordância com os obtidos por Collette, Zhou e Lorenz (2014), que demonstraram a capacidade de *C. albicans* bloquear a produção NO em macrófagos, pela ação de um pequeno composto aquoso e termoestável. Esse proposto pode explicar, também, a redução da produção de NO quando macrófagos foram estimulados por metabólitos da co-cultura de *C. albicans* e MSSA em comparação pelo estímulo isolado dos metabólitos de MSSA.

Viard-leveugle et al. (2013) relatou uma correlação positiva entre a produção de TNF-α e a produção de NO, o que está em concordância com os resultados obtidos, nos quais os macrófagos estimulados pelos metabólitos do biofilme de MSSA e polimicrobiano produziram níveis proporcionais de NO e TNF-α.

Quando em associação com *C. albicans*, MSSA tem a produção de L-lactato desidrogenase 1 (Ldh1), aumentada. Essa enzima está relacionada, entre outros fatores, à sobrevivência de MSSA em ambientes altamente tóxicos (PETERS et al., 2010).

Este fato pode embasar os dados de UFC obtidos, nos quais obteve-se mais unidades formadoras de colônia de MSSA provenientes do biofilme polimicrobiano do que do biofilme isolado de MSSA.

Ainda de acordo com o ANEXO A (ZAGO et al., 2015) tanto a produção de SAP quanto a de PL-C pelo biofilme polimicrobiano, são significativas, aliado a isso, estudos de proteômica demonstraram a regulação positiva de outras 27 proteínas, o que indica um fenótipo possivelmente mais patogênico da co-cultura de *C. albicans* e MSSA (ZAGO et al., 2015; PETERS et al., 2010).

Com isso, esperava-se maior produção de citocinas nos macrófagos estimulados pelo biofilme polimicrobiano, porém, para todas as citocinas aqui avaliadas, a produção foi maior quando os macrófagos foram estimulados por metabólitos do biofilme isolado de MSSA. Peters; Noverr (2013) obtiveram um perfil de liberação de citocinas diferente do demonstrado, quando induziram peritonite em ratos utilizando culturas isoladas de *C. albicans*, MSSA e a co-cultura desses microrganismos. Quando co-infectados os ratos produziram cinco vezes mais IL-6 e outras citocinas do que quando infectados de forma isolada. Porém, como no presente estudo os macrófagos foram estimulados apenas com metabólitos dos biofilmes, e não com componentes desses em si, talvez a relação entre esses metabólitos e as células não seja suficiente para provocar tal resposta inflamatória.

A menor produção de citocinas no estímulo com os metabólitos do biofilme polimicrobiano em relação ao estímulo por metabólitos de MSSA também pode estar relacionada ao fato de que, quando MSSA e *C. albicans* estão em sinergismo, a bactéria apresenta uma estratégia de evasão do sistema imune através da regulação positiva do gene CodY, que é repressor de fatores de virulência em cepas de *S. aureus*. (PETERS et al., 2010).

Dessa forma, o biofilme é camuflado através de uma menor produção de fatores de virulência e maior produção de sistemas que garantem a sua sobrevivência dentro do organismo hospedeiro. Esse mecanismo, associado ao maior número populacional de MSSA no biofilme polimicrobiano, pode representar um potencial mais patogênico da co-cultura de fungo e

bactéria em relação aos biofilmes isolados. O que é evidenciado por resultados, ainda não publicados, obtidos pelo grupo de pesquisa, que demonstraram que apesar da menor produção de citocinas no estímulo pelo biofilme polimicrobiano em relação ao biofilme de MSSA isolado, o biofilme da co-cultura fungo/bactéria apresentou maior toxicidade e indução de apoptose em queratinócitos.

Para um melhor entendimento da relação dos metabólitos dos biofilmes com a produção de citocinas, seria necessária realização de mais experimentos, adicionando-se outras variáveis e controles. Um exemplo de nova variável seria, além de estimular os macrófagos com os metabólitos do biofilme polimicrobiano e dos biofilmes isolados de *C. albicans* e MSSA, criar mais um grupo experimental, no qual os macrófagos seriam estimulados com a junção dos metabólitos dos biofilmes de *C. albicans* e MSSA, que cresceram e foram processados separadamente, e colocados ambos em contato com células J774A.1. Este novo grupo possibilitaria avaliar se a menor produção de citocinas nos macrófagos estimulados com metabólitos do biofilme polimicrobiano, em comparação com aqueles estimulados com os metabólitos do biofilme isolado de MSSA, está relacionada ao crescimento dos dois microrganismos em sinergismo, devido a regulação positiva do gene CodY, por exemplo, ou se os metabólitos produzidos por *C. albicans* têm potencial anti-inflamatório frente aos danos causados pelos metabólitos de MSSA em macrófagos J774A.1. Essa avaliação seria ainda mais efetiva ao adicionar-se aos experimentos controles positivos. Como o estímulo de macrófagos com ácido lipoteicóico, ou outras toxinas presentes nos microrganismos estudados, que conhecidamente induzem a produção de citocinas em macrófagos J774A.1. Ademais, estimular os macrófagos com esses indutores conhecidos de resposta inflamatória, acrescidos dos metabólitos do biofilme de *C. albicans*, permitiria avaliar se os metabólitos fúngicos realmente têm um potencial anti-inflamatório e terapêutico.

7. CONCLUSÃO:

Os dados apresentados neste trabalho sugerem um potencial inflamatório dos metabólitos produzidos pelos biofilmes de MSSA e polimicrobiano. A baixa produção de citocinas nos macrófagos estimulados pelo biofilme de *C. albicans*, bem como, a menor produção de citocinas quando os macrófagos foram estimulados pelos metabólitos do biofilme polimicrobiano em comparação às células estimuladas pelos metabólitos do biofilme isolado de MSSA, pode indicar que o fungo esteja produzindo algo que inibe a produção de fatores de virulência em MSSA, como é indicado na literatura, resultando em uma menor resposta inflamatória. Mas também, pode indicar que, os metabólitos do biofilme de *C. albicans* podem ter um efeito anti-inflamatório em macrófagos J774A.1, sendo necessários aprofundar os testes para obter-se resultados conclusivos sobre esse possível efeito terapêutico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANVISA, 2013, Brasília. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.:** Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. 150 p. Disponível em: <http://www.formatoclinico.com.br/wp-content/uploads/2016/04/MICROBIOLOGIA-CLÍNICA-PARA-O-CONTROLE-DE-INFECÇÃO-RELACIONADA-À-ASSISTÊNCIA-À-SAÚDE-06.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2015.

ARCHER, Nathan K. et al. Staphylococcus aureus biofilms. **Virulence,** Baltimore, Md, v. 2, n. 5, p.445-459, set. 2011.

BEUTLER, B. A. The role of tumor necrosis factor in health and disease. **The journal of rheumatology**. Supplement, v. 57, p. 16-21, maio 1999.

BEVERIDGE, Terry J. et al. Interactions between biofilms and the environment. **Fems Microbiology Reviews,** Guelph, Ont, v. 20, n. 3-4, p.291-303, jul. 1997.

BOYD, Aoife; CHAKRABARTY, D A. M. Role of Alginate Lyase in Cell Detachment of Pseudomonas aeruginosa. **Applied And Environmental Microbiology,** Chicago, Illinois, v. 60, n. 7, p.2355-2359, jul. 1994.

CAIAZZA, Nicky C.; O'TOOLE, G. A. Alpha-Toxin Is Required for Biofilm Formation by Staphylococcus aureus. **Journal Of Bacteriology,** Hanover, New Hampshire, v. 185, n. 10, p.3214-3217, maio 2003.

CHADBAN, S. J. et al. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. **Immunology**, v. 94, n. 1, p. 72-78, maio 1998.

CHANDRA, J. et al. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen Candida albicans: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal Of Bacteriology,** [s.l.], v. 183, n. 18, p.5385-5394, 15 set. 2001.

COLLETTE, John R.; ZHOU, Huaijin; LORENZ, Michael C.. Candida albicans Suppresses Nitric Oxide Generation from Macrophages via a Secreted Molecule. Plos One, [s.l.], v. 9, n. 4, p. e96203, 22 abr. 2014.

COSTERTON, J W et al. Microbial Biofilms. **Annual Review Of Microbiology,** [s.l.], v. 49, n. 1, p.711-745, out. 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. P.. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science,** Bozeman, Montana, v. 284, n. 5418, p.1318-1322, 21 maio 1999.

CROES, Sander et al. Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the S. aureus lineage. **Bmc Microbiology,** Maastricht, The Netherlands, v. 9, n. 1, p.229-238, out. 2009. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-229. Disponível em: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-229>. Acesso em: 06 jul. 2016.

DAVEY, Mary Ellen; O'TOOLE, George A.. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews,** Hanover, New Hampshire, v. 64, n. 4, p.847-867, dez. 2000.

DINARELLO, Charles A.. Historical insights into cytokines. **European Journal Of Immunology,** [s.l.], v. 37, n. 1, p.S34-S45, nov. 2007.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms.**Clinical Microbiology Reviews,** Bozeman, Montana, v. 15, n. 2, p.167-193, abr. 2002.

DUQUE, Guillermo Arango; DESCOTEAUX, Albert. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Front. Immunol.,** [laval, Qc, Canada], v. 5, p.1-12, 7 out. 2014.

DUSSE, Luci Maria Sant'ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** [s.l.], v. 39, n. 4, p.343-350, maio 2003.

EZEPCHUK, Yuri V. et al. Staphylococcal Toxins and Protein A Differentially Induce Cytotoxicity and Release of Tumor Necrosis Factor–α From Human Keratinocytes. **Journal of investigative dermatology**, [s.l.], v. 107, n. 4, p. 603-609, 1996.

FAIX, Roger Gordon; KOVARIK, S. M. Polymicrobial sepsis among intensive care nursery infants. **Journal of perinatology**: official journal of the California Perinatal Association, v. 9, n. 2, p. 131-136, 1989.

FANNING, Saranna; MITCHEL, Aaron P.. Fungal Biofilms. **Plos Pathogens,** Pittsburgh, v. 8, n. 4, p.1-4, abr. 2012. Disponível em: <http://journals.plos.org/plospathogens/article/asset?id=10.1371/journal.ppat.1002585.PDF>. Acesso em: 06 jul. 2016.

FINKEL, Jonathan S.; MITCHELL, Aaron P.. Genetic control of Candida albicans biofilm development. **Nature Reviews Microbiology,** Pittsburgh, v. 9, n. 2, p.109-118, fev. 2011. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2475. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189476>. Acesso em: 26 ago. 2016.

FOSTER, Timothy J.; HÖÖK, Magnus. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. **Trends In Microbiology,** [s.l.], v. 6, n. 12, p.484-488, dez. 1998.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, out 1982.

HAMMER, Brian K.; BASSLER, Bonnie L. Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae. **Molecular Microbiology,** Princeton, New Jersey, v. 50, n. 1, p.101-104, 20 ago. 2003.

HAN, Kyoung-hee et al. Immunological Features of Macrophages Induced by Various Morphological Structures of Candida albicans. **Journal Of Microbiology And Biotechnology,** [s.l.], v. 23, n. 7, p.1031-1040, 28 jul. 2013.

HASLINGER-LOFFLER, Bettina et al. Multiple virulence factors are required for Staphylococcus aureus-induced apoptosis in endothelial cells. **Cell Microbiol,** [s.l.], v. 7, n. 8, p.1087-1097, ago. 2005.

HODGE, David R. et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. **Cancer research**, [s.l.], v. 65, n. 11, p. 4673-4682, jun. 2005.

LEITE, Gustavo Balduino. **ANÁLISE DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE Staphylococcus aureus NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASILIA.** 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, Df, 2008.

MATTEI, Antonella Souza et al. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of Candida albicans. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** [s.l.], v. 46, n. 3, p.340-342, jun. 2013.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence,** [Jena, Germany], v. 4, n. 2, p.119-128, 15 fev. 2013.

MOHAN, Vinitha; BALLAL, Mamatha. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in Candida species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia,** [s.l.], v. 25, n. 4, p.208-201, jul. 2008

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.

MOSSER, David M.; ZHANG, Xia. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews,** [s.l.], v. 226, n. 1, p.205-218, dez. 2008

NIEWERTH, M.; KORTING, H. C. Phospholipases of Candida albicans. **Mycoses,** [München, Germany], v. 44, n. 9-10, p.361-367, 2001.

NOBILE, Clarissa j. et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in Candida albicans.**Cell,** [s.l.], v. 148, n. 1-2, p.126-138, jan. 2012.

OLIVEIRA, Felipe Eduardo de. **ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE Lactobacillus rhamnosus EM MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS COM LIPOPOLISACARÍDEO, ÁCIDO LIPOTEICÓICO E MANANA** 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Unesp – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, São José dos Campos, 2013.

PADRÃO, Juliana da Cruz. **IDENTIFICAÇÃO DA VIA DE DEGRADAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA EM MACRÓFAGOS ATIVADOS E INFECTADOS PELO TOXOPLASMA GONDII**. 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado) Mestrado em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular. Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, RJ - Brasil, 2009.
Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGBB_6667_1254402748.pdf>. Acesso em: 19 set. 2016.

PARAJE, M.g. et al. Lipase of Candida albicans induces activation of NADPH oxidase and l-arginine pathways on resting and activated macrophages. **Biochemical And Biophysical Research Communications,** [s.l.], v. 390, n. 2, p.263-268, dez. 2009.

PEREIRA, Cristiane Aparecida et al. Susceptibility of Candida albicans, Staphylococcus aureus, and Streptococcus mutans biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers In Medical Science,** [s.l.], v. 26, n. 3, p.341-348, 11 nov. 2010.

PETERS, Brian M. et al. Microbial interactions and differential protein expression in Staphylococcus aureus–Candida albicans dual-species biofilms. **Fems Immunology & Medical Microbiology,** [Baltimore], v. 59, n. 3, p.493-503, ago. 2010.

PETERS, Brian. M. et al. Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology,** [Baltimore], v. 158, n. 12, p.2975-2986, 23 ago. 2012

PETERS, Brian M.; NOVERR, Mairi C. Candida albicans-Staphylococcus aureus polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. **Infection and immunity**, [Baltimore], v. 81, n. 6, p. 2178-2189, 2013.

PIETRELLA, D. et al. The Inflammatory Response Induced by Aspartic Proteases of Candida albicans Is Independent of Proteolytic Activity. **Infection And Immunity,** [s.l.], v. 78, n. 11, p.4754-4762, 16 ago. 2010.

PULIMOOD, Suzanne et al. Polymicrobial candidemia. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 44, n. 4, p. 353-357, 2002.

RAAD, Issam. Intravascular-catheter-related infections. **The Lancet,** Houston, Tx, v. 351, n. 9106, p.893-898, mar. 1998.

RAMAGE, Gordon et al. Inhibition of Candida albicans biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Applied and environmental microbiology**, San Antonio, Tx; v. 68, n. 11, p. 5459-5463, 2002.

RESCH, Alexandra et al. Comparative proteome analysis of Staphylococcus aureus biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. **Proteomics,** [s.l.], v. 6, n. 6, p.1867-1877, mar. 2006.

SANTOS, André Luis dos et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab,** [s.l.], v. 43, n. 6, p.413-423, dez. 2007.

SCHELLER, Jürgen et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research,** [s.l.], v. 1813, n. 5, p.878-888, maio 2011.

SHIRTLIFF, Mark E.; PETERS, Brian M.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Cross-kingdom interactions: Candida albicans and bacteria. **Fems Microbiology Letters, [**Baltimore], v. 299, n. 1, p.1-8, out. 2009.

SINGH, R. et al. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy,** Chandigarh, v. 65, n. 9, p.1955-1958, 8 jul. 2010.

STORTI, Anisio. **COLONIZAÇÃO DE CATETERES VENOSOS CENTRAIS POR BIOFILME MICROBIANO.** 2006. 140 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas (Área de Microbiologia Clínica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2006.

UPPULURI, Priya et al. Dispersion as an Important Step in the Candida albicans Biofilm Developmental Cycle. **Plos Pathog,**[s.l.], v. 6, n. 3, p. e1000828, 26 mar. 2010. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828. Disponível em: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000828>. Acesso em: 01 set. 2016.

VIARD-LEVEUGLE, Isabelle et al. TNF-α and IFN-γ are potential inducers of Fas-mediated keratinocyte apoptosis through activation of inducible nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 489-498, fev 2013.

VISTICA, David T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, v. 51, n. 10, p. 2515-2520, maio 1991.

XU, Karen D.; STEWART, Philip S.; MCFETERS, Gordon A. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology,** Bozeman, Montana, v. 146, n. 3, p.547-549, 1 mar. 2000.

ZAGO, Chaiene Evelin et al. Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between Candida albicans and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Plos One,** Araraquara, v. 10, n. 4, p.1-15, 13 abr. 2015.

ANEXO A

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between Candida albicans and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Chaiene Evelin Zago[1], Sónia Silva[2], Paula Volpato Sanitá[1], Paula Aboud Barbugli[1], Carla Maria Improta Dias[1], Virgínia Barreto Lordello[1], Carlos Eduardo Vergani[1]*

1 Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP—Univ Estadual Paulista. Araraquara, São Paulo, Brazil, 2 IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Center of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

* vergani@foar.unesp.br

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CMI, Lordello VB, et al. (2015) Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between Candida albicans and Methicillin-Susceptible (MSSA) and -Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). PLoS ONE 10(4): e0123206. doi:10.1371/journal. pone.0123206

Academic Editor: Ali Al-Ahmad, University Hospital of the Albert-Ludwigs-University Freiburg, GERMANY

Received: November 7, 2014

Accepted: March 2, 2015

Published: April 13, 2015

Copyright: © 2015 Zago et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel), CNPq (Council for Technical and Scientific Development) (Grant 400658/2012-7) and Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal (SFRH/BPD/71076/2010). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Polymicrobial biofilms are an understudied and a clinically relevant problem. This study evaluates the interaction between C. albicans, and methicillin- susceptible (MSSA) and re-sistant (MRSA) S. aureus growing in single- and dual-species biofilms. Single and dual spe-cies adhesion (90 min) and biofilms (12, 24, and 48 h) were evaluated by complementary methods: counting colony-forming units (CFU mL^{-1}), XTT-reduction, and crystal violet stain-ing (CV). The secretion of hydrolytic enzymes by the 48 h biofilms was also evaluated using fluorimetric kits. Scanning electron microscopy (SEM) was used to assess biofilm structure. The results from quantification assays were compared using two-way ANOVAs with Tukey post-hoc tests, while data from enzymatic activities were analyzed by one-way Welch-ANOVA followed by Games-Howell post hoc test (α = 0.05). C. albicans, MSSA and MRSA were able to adhere and to form biofilm in both single or mixed cultures. In general, all micro-organisms in both growth conditions showed a gradual increase in the number of cells and metabolic activity over time, reaching peak values between 12 h and 48 h (ρ<0.05). C. albi-cans single- and dual-biofilms had significantly higher total biomass values (ρ<0.05) than single biofilms of bacteria. Except for single MRSA biofilms, all microorganisms in both growth conditions secreted proteinase and phospholipase-C. SEM images revealed exten-sive adherence of bacteria to hyphal elements of C. albicans. C. albicans, MSSA, and MRSA can co-exist in biofilms without antagonism and in an apparent synergistic effect, with bacteria cells preferentially associated to C. albicans hyphal forms.

Introduction

Biofilms are described as a microbial population attached to a substrate, surrounded by a self-derived extracellular matrix. This mode of life presents important clinical repercussions since it

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

is estimated that over half of all hospital infections are originated from these microbial commu-nities [1]. The relevance of this is that biofilm cells are phenotypically distinct from their 'free-living' or planktonic forms, exhibiting elevated resistance to host defenses and higher tolerance to antimicrobial agents [2]. Besides the colonization of the oral mucosal surfaces, biofilms can develop on abiotic substrates, including the internal surfaces of dentures [2,3]. Therefore, bio-films act as reservoirs of pathogenic microorganisms [3–5] favoring the dissemination of infec-tion to other body sites [6,7]. Synergistic, mutualistic, and antagonistic interactions that occur between microorganisms contribute to the development of polymicrobial biofilm communities [8,9]. Currently, the Staphylococcus aureus and Candida species are ranked among the top three bloodstream pathogens causing severe morbidity and mortality in hospitalized patients [4,10]. Besides the fact that Candida albicans and S. aureus are responsible for a substantial number of infections independently, there is increasing evidence that they can be commonly associated as co-infector microorganisms [5,11–14]. The clinical outcome of these mixed bac-terial-fungal interactions is that the infections can correlate with increased frequency or severi-ty of disease [11,15,16]. Infections due to polymicrobial biofilms have also been related to significantly higher mortality rates (70%) when compared to infections caused by a single spe-cies of microorganism (23%) [17].

C. albicans is a commensal colonizer of oral mucous membranes that can become an oppor-tunistic pathogen and is considered the most prevalent [3] and virulent [18] of the Candida species. Despite its high virulence as a single pathogen, it has been estimated that about 27% of patients with candidemia had polymicrobial blood cultures, with S. aureus as the third most common organism isolated in conjunction with C. albicans [19]. S. aureus methicilin-resistant (MRSA) has also been recognized as one of the most virulent human pathogens, especially due to its ability to develop resistance against several drug therapies [20,21] and to form biofilms [14,22,23]. In fact, approximately 52% of nosocomial infections in patients in intensive care units are due to MRSA [24], which is responsible for severe infections, such as aspiration pneu-monia [25,26].

There is increasing evidence in the literature regarding the importance of polymicrobial in-fections and some studies have focused on the interactions between the eukaryotic pathogen C. albicans and the prokaryotic pathogen S. aureus [5,11–14]. At the moment, it is known that the synergy between these pathogens in a biofilm results in a stronger biofilm formation with in-creased antimicrobial tolerance [5,12]. In addition, higher mortality rates in mice co-infected with sublethal levels of these microorganisms have been observed [11]. Despite of these studies, some gaps in the virulence attributes of these microorganisms in biofilms still remain to be in-vestigated. In polymicrobial communities, the effect of these specific virulence factors may be influential and perhaps potentiate the pathogenicity of these biofilms. Among these virulence factors, the secretion of specific degradative enzymes can be highlighted as one of the most sig-nificant, since they are involved in colonization and infection processes [27,28]. To the author's knowledge, the quantification of some hydrolytic enzymes in polymicrobial biofilms has not yet been conducted. Despite the fact that C. albicans and S. aureus are often co-isolated in cases of biofilm associated infections [29], literature on the interactions between these pathogens is limited and should be further explored in a more comprehensive way. Thus, the aim of the present study was to investigate the dynamic interaction between C. albicans and methicillin-susceptible (MSSA) and-resistant S. aureus (MRSA) in terms of characterization of the viable cells, metabolic activity, and total biomass of biofilms. In addition, the quantification of the ex-tracellular hydrolytic enzymes aspartyl proteinase (SAP) and phospholipase C (PL-C) in these biofilms using a highly sensitive fluorimetric method was evaluated.

Material and Methods

Strains and growth conditions

Three reference strains were used in this study. Candida albicans wild-type strain from the Spain Collection (SC5314), a human clinical isolate, was selected based on its high ability to grow in the invasive hyphal form [30,31]. Two reference Staphylococcus aureus from the Amer-ican Type Culture Collection Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA—ATCC 25923) and methicillin-resistant S. aureus (MRSA—ATCC 33591) strains were selected be-cause they are capable of biofilm formation in vitro [32,33]. In addition, these strains were also used in other investigations where the interaction of Candida-Staphylococcus biofilms was eval-uated [5,12–14].

C. albicans was maintained in Yeast Peptone Glucose medium (YEPD: 1% yeast extract, 2% Bacto peptone and 2% D-glucose, 2% agar) and frozen at -70°C until use. The microorganism was subcultured onto Sabouraud Dextrose Agar plates (SDA—Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) [34] supplemented with chloramphenicol (0.05 g L^{-1}) and incubated at 37°C for 24–48 h to generate the C. albicans yeast used for all the experiments.

Bacteria strains were maintained in Tryptic Soy Broth medium (TSB—Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) [33] and frozen at -70°C until use. The microorganisms were subcultured onto Mannitol Salt Agar plates (Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) [33] and incubated at 37°C for 24–48 h to generate the bacteria cells used for the experiments.

To prepare the yeast and bacteria inocula, a loop full of the agar stock cultures was transferred to 5 mL of Yeast Nitrogen Base broth (YNB—Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA) supplemented with 100 mM glucose and TSB, respectively, and incubated at 37°C over-night in an orbital shaker (75 rpm). Cells of the resultant cultures were harvested and washed twice with phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.2) at 5,000 x g for 5 min (rotor model A462). Washed microorganisms were re-suspended in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Both Candida and Staphylococcus suspensions were spectrophotometri-cally standardized at an OD540 nm of 1.0 and OD600nm of 0.1, respectively, which corre-sponds to a final concentration of 10^7 cells per mL^{-1} [14].

Adhesion and biofilm formation

Single species adhesion and biofilms assays were carried out on 96-well microplates (Orange Scientific, Belgium) containing 75 μL of RPMI 1640 and 75 μL of each cellular suspension. Dual species adhesion and biofilm formation were also performed in 96-well microplates con-taining 75 μL of the suspension of each microorganism used in the following associations: C. albicans + MSSA and C. albicans + MRSA. For the adhesion assays, culture plates were incu-bated at 37°C in an orbital shaker (75 rpm) for 90 min. For the biofilm formation, the plates were also incubated for 90 min at 37°C in an orbital shaker (75 rpm). The non-adherent cells were then removed by gently washing twice with 150 μL PBS and 150 μL of fresh RPMI 1640, added to each well. The plates were incubated for 12 h, 24 h, and 48 h. In the case of the 48 h biofilms, 75 μL of the suspensions were removed and an equal volume of fresh RPMI 1640 was added after the first 24 h.

Quantification of adhered and biofilm cells

The number of adhered cells and those present in the biofilms was determined by counting colony-forming units (CFUs). The wells were briefly washed twice with PBS to remove loosely attached cells and resuspended in 100 μL of PBS. Next, the adhered biofilm was carefully scraped off the wells with a sterile pipette tip for 1 min [35]. Cristal violet (CV) staining as described

below was used to confirm the complete removal of the adhered cells and biofilms. The 100 μL suspensions were then vigorously vortexed to separate a possible aggregation among the cells. Serial decimal dilutions (in PBS) were made and the number of C. albicans was determined by pipeting replicate specimens (25 μL) of the suspensions on SDA medium supplemented with chloramphenicol. The same procedures were performed for the MSSA/MRSA cells, which were plated on Mannitol Salt Agar [10,33]. For the dual species studies, serial dilutions were plated onto both media. The plates were incubated for 24h-48 h at 37°C and the values of CFU mL^{-1} were counted. The experiments were performed in five replicates and repeated in three independent assays.

Quantification of metabolic mitochondrial activity

The total metabolic activity of adherent and biofilm cells was measured through the 2,3-bis re-duction assay (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazo-liumhydroxide (XTT) using a previous described method [36]. After 90 min of adhesion and 12 h, 24 h, and 48 h of biofilm formation, the XTT (Sigma) was prepared in ultrapure water at a final concentration of 1 mg mL^{-1}. The solution was filter sterilized and stored at -70°C until use. The menadione solution (Sigma) was prepared in acetone at 0.4 mM immediately before each assay. The wells of a 96-well tissue plate were washed with 150 μL of PBS (0.1 M, pH 7) and a mixture of 158 μL YNB with 200 mM glucose, 40 μL XTT, and 2 μL menadione was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 3 h in the dark and the absorbance at 492 nm was then read in an ELISA plate reader in the 96-well tissue plates. The experiments were performed in five replicates and repeated in three independent assays.

Quantification of total biofilm biomass

Total biofilm biomass was measured using a CV staining method as described before [36]. Briefly, after 12h, 24h, and 48 h of biofilm formation, the medium was totally aspirated and the non-adherent cells removed by washing the wells with 150 μL of PBS. The single and dual-spe-cies biofilms were then fixed with 200 μL of 100% (v/v) methanol, which was removed after 15 min. The culture plates were allowed to dry at room temperature and 200 μL of CV (1% v/v) was then added to each well and incubated for 5 min. The wells were gently washed twice with 150 μL of PBS and 200 μL of acetic acid (33% v/v) was added to release and dissolve the stain. Optical density (Absorbance) of the eluted solution was read in a microtiter plate reader (Bio-Tek Synergy HT, Izasa) at 570 nm. The experiments were performed in five replicates and re-peated in three independent assays.

Quantification of extracellular hydrolytic enzymes

The supernatants of the 48 h single- and dual-species biofilms were centrifuged for 5 min at 5,000 rpm to remove any cells and evaluated for secreted aspartyl proteinase (SAP) activity using the fluorimetric EnzChek Protease Assay kit for green fluorescence (Molecular Probe, Inc., Eugene, OR, USA), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 0.2 mL of the BODIPY FL casein stock solution (1.0 mg mL^{-1}) and 19.8 mL of the digestion buffer (dilut-ed 1:20) were prepared and mixed. Thereafter, 100 μL of the working solution were added to 100 μL of the centrifuged supernatants in black 96-well microplates for fluorescence detection (Greiner Bio ONE, Frickenhausen, Germany) and the plates were incubated for 2 h at room temperature, protected from light. The fluorescence was read in a fluorescence microplate reader (Fluoroskan Ascent microplate fluorometer, USA) at 485 nm of excitation and 538 nm of emission. The fluorescence values were used in linear equations derived from the previously obtained standard curves and the enzymatic activity was expressed in μg mL^{-1}.

For the phospholipase C (PL-C) assay, the 48 h single- and dual-species biofilms were resuspended in a lysis buffer (2 M Tris- HCI, 1 M $CaCl_2$, ultra-purified water, pH 7.4), sonicated for 20 seconds to disrupt the biofilms, and centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. To evaluate the PL-C activity, the Amplex Red phosphatidylcholine-specific phospholipase C assay kit (Molec-ular Probe, Inc., Eugene, OR, USA) was used, according to the manufacturer's recommenda-tions. Briefly, a working solution was prepared mixing 200 μL of Amplex Red reagent stock solution (20 mM), 100 μL of horseradish peroxidase stock solution, 200 μL of alkaline phos-phatase stock solution, 100 μL of choline oxidase stock solution, and 78 μL of the lecithin solu-tion to 9.32 mL of Reaction Buffer (1:5). The assays were performed in black 96-well microplates, in a total volume of 200 μL per well (100 μL of the product of the centrifugation of the biofilms and 100 μL of the working solution). The plates were then incubated for 3 h at 37°C, protected from light. The fluorescence was read in a fluorescence microplate reader at 544 nm of excitation and 590 nm of emission. The fluorescence values (nm) were recorded and used for comparisons in relation to the fluorescence values of the positive controls provided by the manufacturer [purified PL-C from Bacillus cereus and Hydrogen Peroxide (H_2O_2)].

For both enzymes, all tests were performed on three separate occasions, with four samples in triplicate for each experimental condition.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the biofilm structures and the inter-actions between the Candida and Staphylococcus cells. For this assay, single- and dual-species biofilms were formed on polystyrene disks cut to loosely fit in the 24-well microplates (Orange Scientific, Belgium). Thus, after 90 min, 12h, 24h, and 48 h of incubation, the medium was as-pirated and the non-adherent cells removed by washing twice with 1 mL of PBS. The discs were then dehydrated with an ethanol series (70% ethanol for 10 min, 95% ethanol for 10 min and 100% ethanol for 20 min) and air dried for 20 min. Disc samples were kept in a desiccator before analysis. Prior to observation, the discs were mounted onto aluminum stubs sputter coated with gold and observed using a Hitachi Tablelap Scanning Electron Microscope TM-3000 (Tokyo, Japan).

Statistical analysis

The results of the CFU, CV, and XTT reduction values were compared using two-way ANOVA with the Tukey post-hoc test. The two factors considered were growth condition (C. albicans, MSSA, MRSA, C. albicans + MSSA, and C. albicans + MRSA) and time period (90 min, 12h, 24h, and 48h for the CFU mL^{-1} and XTT assays, and 12h, 24h, and 48h for the CV assay).

For the SAP and PL-C activities, only the growth factor condition was analyzed using one-way ANOVA (Welch ANOVA in cases of unequal variance) followed by the Games-Howell post hoc test.

All tests were performed using the SPSS statistical software package (SPSS Inc., Chicago, USA) with a confidential level of 95%.

Results

Quantification of adhered and biofilm cells

Table 1 shows the summary of the ANOVAs for all virulence factors analyzed. C. albicans, MSSA and MRSA were able to adhere (90 min) and to form biofilms either in single state or in mixed cultures. Table 1 shows that the time period factor had a significant effect ($p<0.0001$) on the $\log_{10}$ CFU mL^{-1} values of C. albicans. Fig 1A shows a small but gradual increase in the

Table 1. ANOVAs for mean values of log_{10} CFU mL^{-1}, Abs CV, Abs XTT, SAP activity, and PL-C activity for C. albicans and bacteria results.

			DF†	F-value	ρ-value
log_{10}CFU mL^{-1}	C. albicans	Period of time	3	56.5166	<0.0001*
		Growth condition	2	0.7846	0.5381
		Interaction	6	1.5518	0.1635
	Bacteria	Period of time	3	337.5055	<0.0001*
	(MSSA/MRSA)	Growth condition	3	15.1278	<0.0001*
		Interaction	9	4.1278	0.0002*
Abs CV		Period of time	2	44.7022	<0.0001*
		Growth condition	4	206.437	<0.0001*
		Interaction	8	3.7525	0.0006*
Abs XTT		Period of time	3	268.3263	<0.0001*
		Growth condition	4	187.3755	<0.0001*
		Interaction	12	21.2554	<0.0001*
SAP activity		Growth condition	3	326.653	<0.0001*
PL-C activity		Growth condition	6	82.697	<0.0001*

†DF: Degrees of Freedom.

*Significant differences at ρ<0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0123206.t001

log_{10} CFU mL^{-1} values over time and, at 48 h, the number of cells of all growth conditions was significantly higher than in the other time periods (ρ<0.05).

For the bacteria, both factors analyzed had a significant effect (ρ<0.0001) on the log_{10} CFU mL^{-1} values (Table 1). Regardless of whether they were grown as single- or dual-species biofilms, there was a gradual increase in the log_{10} CFU mL^{-1} values over time (Fig 1B), reaching the peak values at 48 h (ρ<0.05). It was also observed that the number of MSSA cells increased significantly (ρ<0.05) when cultured in the presence of C. albicans at 48 h (Fig 1B).

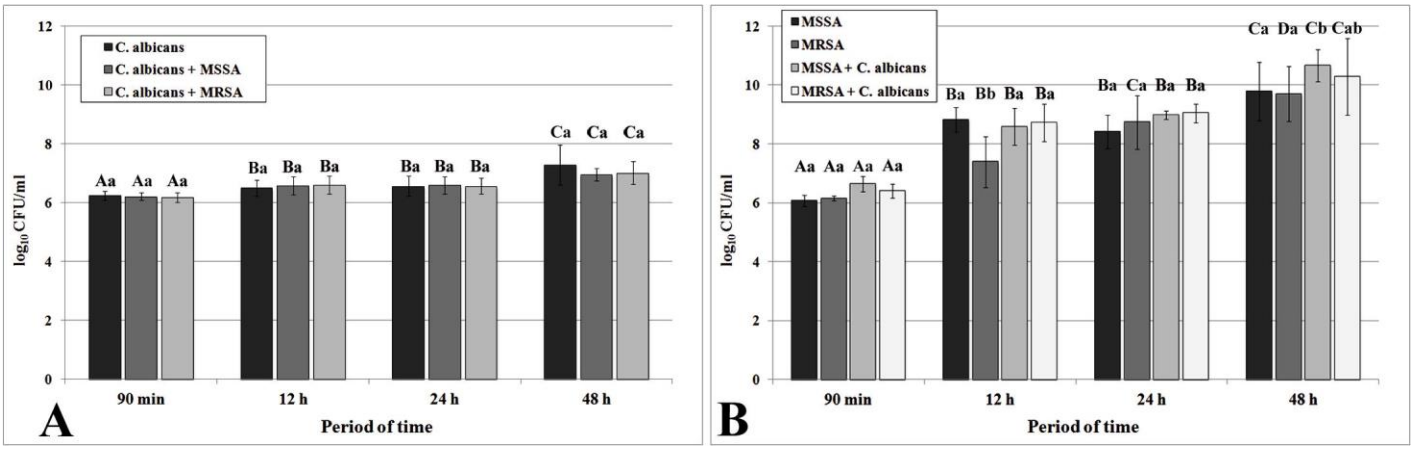


Fig 1. Mean log_{10} CFU mL^{-1} values for grown of C. albicans (A), MSSA and MRSA (B) as single- and dual-species grown in RPMI at 37°C. Error bars represent standard deviation. The uppercase letters show differences among time periods and lowercase letters show differences among the growth conditions (Tukey post-hoc test at ρ>0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0123206.g001

Quantification of metabolic mitochondrial activity

Two-way ANOVA revealed significant effects for the time period and growth condition for the Abs XTT values (Table 1). Except for the MRSA single biofilms, that showed higher metabolic mitochondrial activity at 48 h, all microorganisms in both growth conditions had a significant increase ($\rho<0.05$) in the biofilm metabolic activity from the adhesion period to 12 h of biofilm formation, after which no changes were observed (Fig 2).

When the growth condition factor was analyzed, from the adhesion phase to the 24 h biofilm formation, there were no significant differences ($\rho>0.05$) in the metabolic activity between the single and dual cultures with C. albicans, which had higher values of Abs XTT ($\rho<0.05$) than the single bacteria cultures. At 12 h and 24 h of biofilm growth, the MRSA single-species biofilm presented significantly lower values ($\rho<0.05$) of metabolic activity than the MSSA. At 48 h of biofilm formation, there were no significant differences ($\rho>0.05$) among single- and dual-species biofilms, with the exception of the C. albicans biofilm, which presented higher metabolic activity than that of the MRSA ($\rho<0.05$).

Quantification of total biofilm biomass

Two-way ANOVA revealed significant effects for the time period and growth conditions for the Abs CV values (Table 1). Fig 3 presents the results for total biomass of single and dual

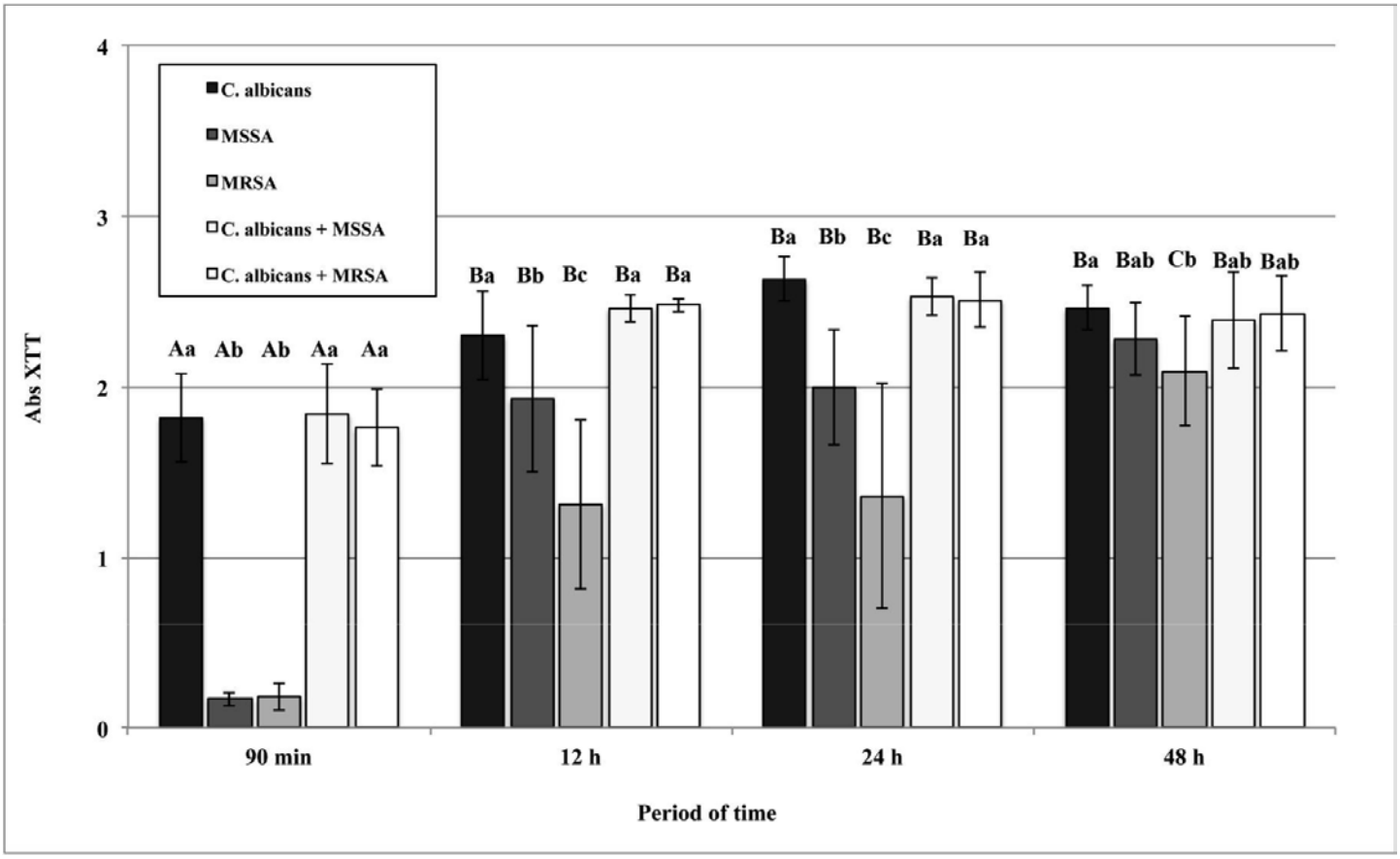


Fig 2. Absorbance values of XTT reduction (Abs XTT) obtained from 90 min of adhesion and biofilms of C. albicans, MSSA, and MRSA as single-and dual-species grown in RPMI at 37°C. Error bars represent standard deviation. The uppercase letters show differences among time periods and lowercase letters show differences among the growth conditions (Tukey post-hoc test at $\rho>0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0123206.g002

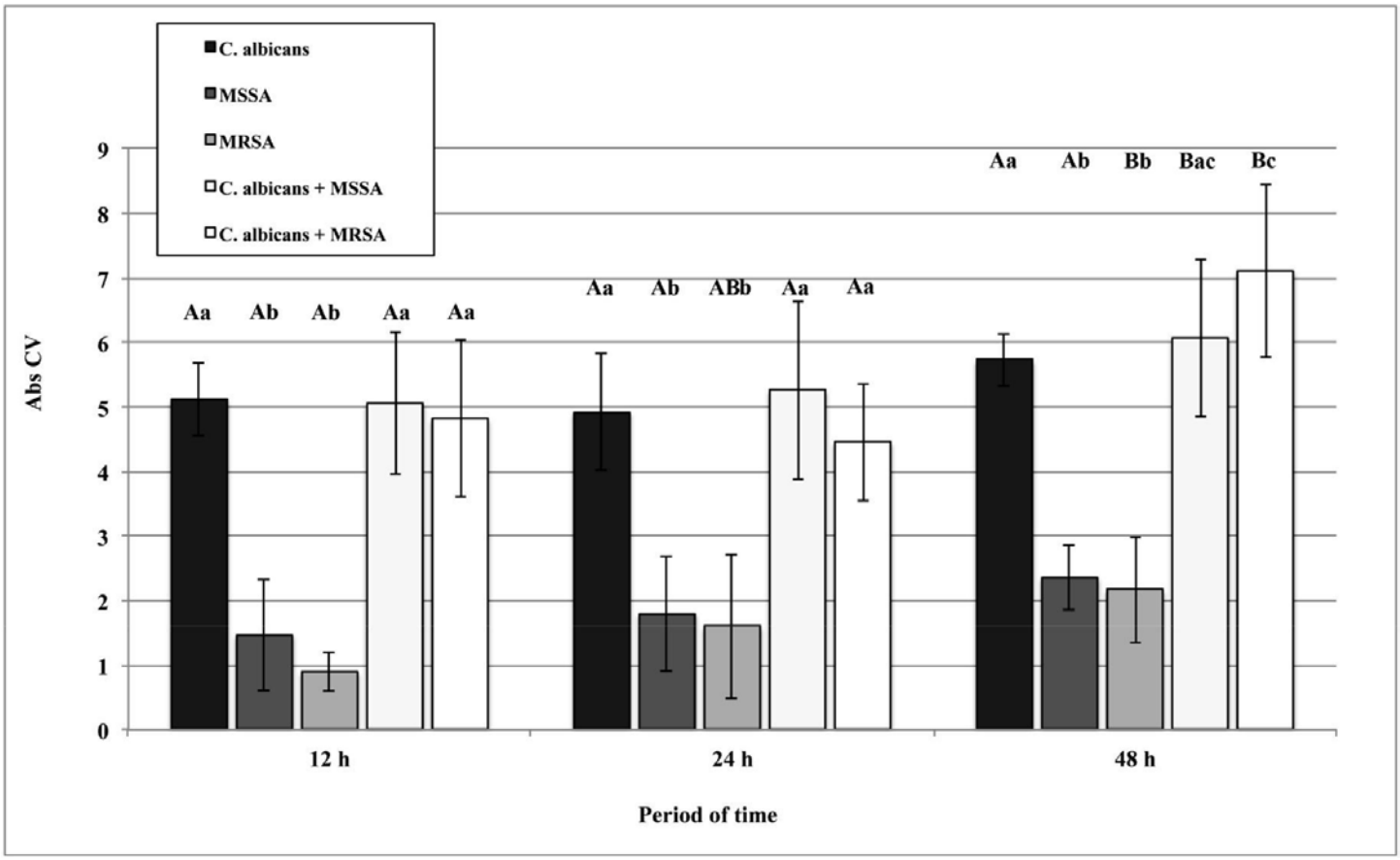


Fig 3. Absorbance values of CV solutions (Abs CV) obtained from biofilms of C. albicans, MSSA, and MRSA as single- and dual-species grown in RPMI at 37°C. Error bars represent standard deviation. The uppercase letters show differences among time periods and lowercase letters show differences among the growth conditions (Tukey post-hoc test at ρ>0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0123206.g003

biofilms of C. albicans, MSSA and MRSA. Generally, C. albicans single and mixed biofilms had significantly higher total biomass values (ρ<0.05) than the single biofilms of bacteria. Except for the significant increase in total biomass of the single MRSA biofilm at 24 h, all growth con-ditions showed no changes from 12 h to 24 h biofilm formation (ρ>0.05). While both mixed biofilms increased the total biomass from 24 h to 48 h (ρ<0.05), no significant change was ob-served for the C. albicans single biofilm.

Quantification of extracellular hydrolytic enzymes

One-way Welch ANOVA revealed significant effects of growth condition in the SAP and PL-C activities (Table 1). For the SAP activity, the single biofilm of C. albicans and the mixed biofilm of C. albicans plus the MRSA produced significant lower amounts (ρ<0.001) of SAP when com-pared to the single biofilm of MSSA and the mixed biofilm of C. albicans plus MSSA (Fig 4A). The enzymatic activity of the single biofilm of MRSA was not detected using the fluorimetric kit. The fluorimetric values for PL-C activity are presented in Fig 4B. C. albicans single and mixed biofilms had significantly higher fluorimetric values (ρ<0.05) than the single biofilms of bacte-ria. Both positive controls showed higher fluorimetric values (ρ<0.05) than C. albicans, MSSA, and MRSA in all growth conditions.

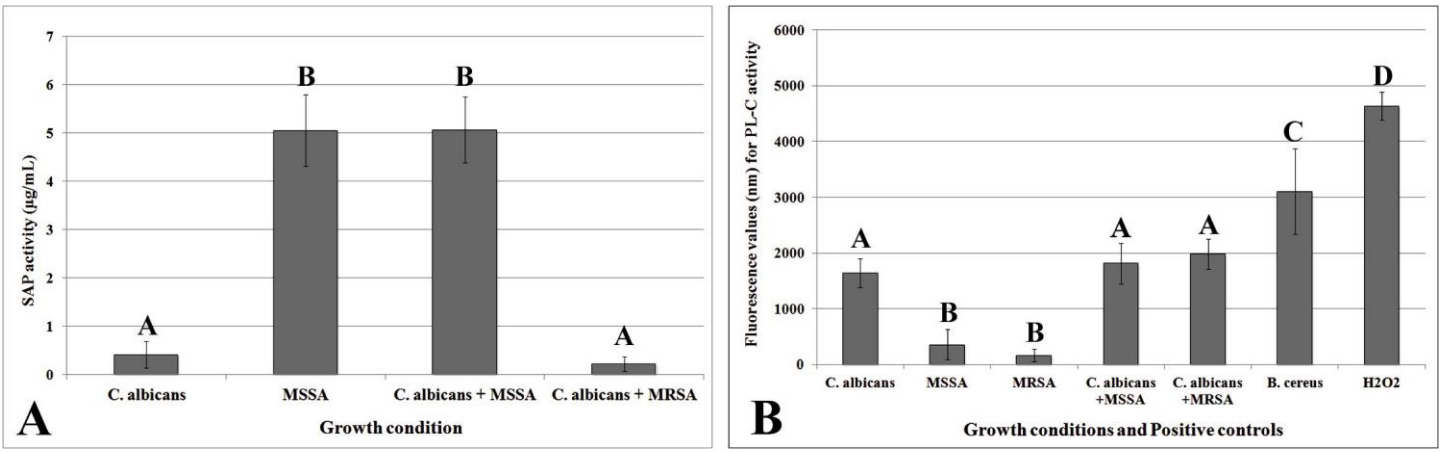


Fig 4. SAP (A) and PL-C (B) activities of biofilms of C. albicans, MSSA, and MRSA, as single- and dual-species grown in RPMI at 37°C, and the positive controls. Error bars represent standard deviation. The uppercase letters show differences among the growth conditions (Games-Howell post-hoc test at ρ>0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0123206.g004

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was used to examine the single and dual adhered and biofilm species in terms of structure and interactions between the candidal and bacteria cells (Fig 5).

The single C. albicans showed, at 90 min, a non-contiguous layer of cells, which presented an initial formation of hyphal forms, and evolved into mature biofilm producing a thickness of co-aggregated cells with a higher number of hyphae at 12 h, 24 h, and 48 h. It is important to emphasize that the 48 h biofilm formation resulted in a more robust biofilm (Fig 5). The single MSSA and MRSA, at the initial phase of 90 min, revealed a similar extent of adhesion with lower quantity of uniformly distributed cells. The structure of both biofilm strains was compa-rable, despite that the MSSA biofilms presented a higher number of intimately packed cocci (Fig 5).

Fig 5 also represents the dual species physical interactions. Images revealed extensive adher-ence of MSSA and MRSA to C. albicans, with a preferential association to the hyphal elements of C. albicans and to a lesser degree, the round yeast cells. In fact, after 90 min of interaction, the bacteria cells were able to interact with the C. albicans cells. In addition, it is important to highlight that in areas of dense hyphal biofilm growth, the MSSA and MRSA cells appear in higher quantity than in the well surface.

Discussion

In the present study, the CFU, XTT, and crystal violet assays were used to evaluate the interactions of single and dual biofilms because these methodologies are complementary. The crystal violet biomass assay quantifies the matrix of both living and dead cells. Because all cells and matrix are stained in this method, it provides the general condition of the biofilm. However, neither the viable cells of the biofilm nor their metabolic activity is evaluated. To discriminate between living and dead cells, the CFU method was chosen because it is the widely gold stan-dard method used. Its noteworthy advantage is that only the viable cells are counted, excluding the dead ones and debris. However, this method quantifies all viable cells, including those with low metabolic activity. Thus, another quantification method based on the metabolic activity (XTT) was used in the present study. For all methodologies, the biofilm formation was stopped at 48 h because the biofilms are sufficiently mature at this time point [2,37,38]. In addition, this

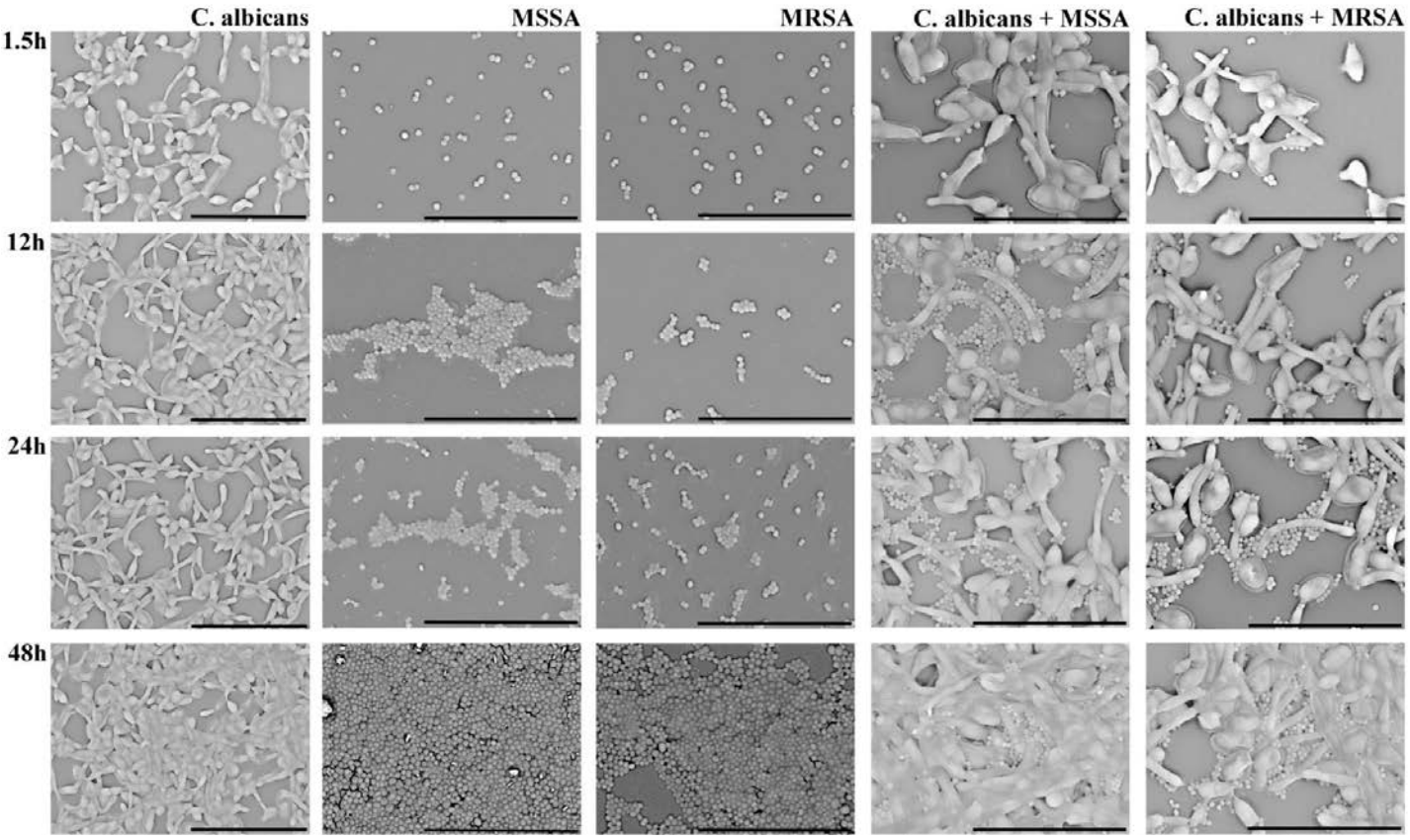


Fig 5. Scanning electron microscopy of adhered single- and dual-species (90 min) and biofilms (12 h, 24 h, and 48 h) of C. albicans, MSSA, and MRSA in RPMI at 37°C. The bar in images corresponds to 20 μm for C. albicans (magnification of x2500) and 20 μm for bacteria and mixed growth (magnification of x5000).

doi:10.1371/journal.pone.0123206.g005

protocol of biofilm formation has already been adopted by other studies that evaluated single and dual biofilms [9,13].

The results of the present investigation showed that all three pathogenic microorganisms were able to adhere in a similar extent, with no apparent antagonism (Fig 1). This initial attach-ment of cells was followed by cell division, proliferation, and biofilm development. The current study also demonstrated that, under the conditions tested, all strains were able to form bio-films, although in different extents (Figs 1, 2, 3, and 5). Indeed, it was not observed that the bac-teria's number decreased over time in the presence of C. albicans, indicating the ability of the yeasts and bacteria to co-inhabit. C. albicans levels in single- and dual-biofilms were not differ-ent (Fig 1 A). It is important to emphasize that, in the presence of C. albicans, the number of bacteria cells increased in specific periods of time comparatively to its single biofilms (Fig 1 B). Similar results were also observed by Harriott & Noverr [5], who monitored fungal and bacteri-al growth within biofilms and observed that while the C. albicans levels presented no changes in the single- and dual-biofilms, the S. aureus levels were significantly increased in the dual bio-films. A possible explanation for this phenomenon could be the presence of higher quantity of glucose, a major component of the C. albicans matrix [39]. In fact, glucose can provide a car-bon source for S. aureus growth and increase its biofilm formation [5].

Considering the metabolic activity assay, it was observed that, from the adhesion phase until the earlier biofilm formation at 24 h, the metabolic activity of single and dual cultures with C. albicans were higher than the single bacteria, as expected. In fact, single MSSA and

MRSA biofilms only achieved similar metabolic activity values at the 48 h period. Since biofilm cells are organized into structured communities embedded within an extracellular matrix, ac-tivity within biofilms would be dependent on nutrient access and availability of oxygen, togeth-er with removal of waste products [35]. These factors may vary because of inherent differences in the biofilms produced by the different microorganisms tested here, resulting in variations in biofilm metabolic activity. In addition, in the present study, RPMI media was used for biofilm formation because, according to the literature [40], it induces hyphal development. This may have influenced the metabolic results due to the lack of some nutrients for both microorgan-isms. From Fig 3, it can be seen that both the C. albicans and dual species biofilms produced higher biofilm biomass than the bacteria monomicrobial biofilms. Bamford et al. [41], who in-vestigated a biofilm formed by Streptococcus gordonii and C. albicans, also noted that complex physical and chemical interactions between microorganisms resulted in an increased biomass of co-inoculated biofilms. More recently, a similar interaction pattern has been reported for C. albicans and MRSA [42].

It is important to highlight that a direct comparison of total biofilm biomass and metabolic activity may mislead, since there are significant differences between bacteria and yeasts, including relative cell size, morphology, and biochemistry. Despite the fact that the literature is sparse on the effects of microbial interaction on metabolic activity, our results are corroborated by a recent study, in which dual biofilms of C. albicans and S. aureus showed higher metabolic activity than the single bacteria biofilms [13]. This result is important given the fact that biofilm activity is significant in terms of pathogenicity since it is a likely indicator of growth, production of hydrolytic enzymes and, in the case of reduced activity, of possible resistance to antimicrobi-al activity [35]. The ability of these two organisms to maintain the growth and metabolic activi-ty when they are together may have potential clinical implications for polymicrobial infections. In fact, in vivo studies demonstrated that mice inoculated with S. aureus showed low mortality, whereas the co-inoculation with C. albicans resulted in a higher rate of mortality [11,42]. A recent study also found that co-infection with these microorganisms led to a 40% mortality rate and increased microbial burden in the spleen and kidney by day 1 post-infection [42]. Thus, the interaction between these two organisms appears to be beneficial to each other.

According to the authors' knowledge, there is a lack of studies evaluating the secretion of degradative enzymes by dual biofilms of C. albicans and S. aureus. When compared to other virulence attributes, the secretion of SAP and PL-C has a more pronounced influence on the pathogenicity of the microorganisms. Lyon et al. [43] found a positive correlation between higher SAP and PL-C production and greater adhesion to buccal cells and resistance to flucon-azole of C. albicans isolates. In addition, there is evidence showing that biofilm formation is also positively associated with secretion of hydrolytic enzymes [44]. In the present study, for single biofilms, S. aureus showed higher SAP activity when compared to C. albicans, which in turn produced higher PL-C activity. Interestingly, when the microorganisms were in a co-cul-ture, both enzymes were also produced (Fig 4), which suggests an increased pathogenicity of dual biofilms. Kaminishi and colleagues [45] reported that the SAP produced by C. albicans ap-pears to reduce opsonization and phagocytosis of S. aureus by polymorphonuclear leukocytes, so that the breakdown of the humoral host defense mechanisms caused by the action of C. albi-cans SAP can leave the hosts more vulnerable to microbial infections and aggravate infectious diseases in compromised hosts. In addition, the secretion of SAP by Staphylococcus could help C. albicans to enhance its adhesion to the mucosal layer [46]. The specific roles of these two hy-drolytic enzymes in colonization and infection processes are slightly different. In general, SAPs induce the degradation of a large variety of host proteins, increasing the ability of microorgan-isms to colonize and invade host tissues [47]. SAPs are also able to break down portions of im-munoglobulins, which are glycoproteins synthesized and secreted by plasma cells that function

as antibodies. This mechanism plays a major role in disrupting the humoral host defense [45,48]. The extracellular PLs are capable to target and digest the membrane phospholipids, the major component of all host cell membranes, thereby facilitating microorganism invasion [49]. Since PLs are concentrated mostly in the tips of the hyphae, such host cell injury would be expected to facilitate the penetration of the infecting microorganisms [50]. In addition, PLs have been found to be a potent inflammatory agent, inducing the accumulation of inflammato-ry cells and plasma proteins and release of various inflammatory mediators in vivo [50]. The fluorimetry methods used in the present study were not able to detect the secretion of SAP by the single biofilm of MRSA. This method is considered more sensitive than the colorimetric's [27,51–53] and those based on the formation of an opaque degradation halo in specific agar plates [28,54–57]. In addition, the fluorimetry assays are considered suitable for research in-volving biofilms [53] and strains with low levels of enzymatic activity [50,56].

The present investigation also showed that extensive interactions did occur between C. albicans and the bacteria growing in mixed biofilms and, in general, C. albicans favors bacterial growth. SEM images revealed an extensive adherence of MSSA and MRSA to C. albicans, with a preferential association to the invasive hyphal elements of C. albicans. In areas of dense hy-phal biofilm growth, the S. aureus cells could be seen completely covering the C. albicans hy-phae (Fig 5). Peters et al. [14] also observed an association between S. aureus cells and invasive hyphal forms of C. albicans, but not the round yeast cells. This interaction was further elucidat-ed by these authors, who observed that S. aureus binds to C. albicans agglutinin-like sequence 3 (als3), which plays a key role in mediating the adherence of bacteria cells to C. albicans hyphae [23]. Because S. aureus preferentially associates with the hyphae, Harriott and Noverr [12] sug-gested that dual biofilm formation is initiated after C. albicans adheres to a substrate surface, which initiates germination. Attachment of S. aureus to the germinating hyphae would pre-sumably occur at the substrate surface and continued growth of both species occurs concomi-tantly. This observation is supported by previous studies that showed that S. aureus was found throughout the depth of the dual biofilm with microcolonies on the surface [5,12,23]. More-over, it has been demonstrated that, when S. aureus was associated with the hyphal forms, it was surrounded with a distinct halo of matrix material secreted by C. albicans. As a result, S. aureus resistance to vancomycin was increased, probably due to the matrix that may limit pen-etration of the drug into the biofilm [5].

Mono or polymicrobial infections are complex processes regulated by a dynamic equilibri-um among the host immune defense, microorganisms' interaction and their virulence factors. This study demonstrated that C. albicans, MSSA, and MRSA can co-exist in a biofilm mode of growth, in an apparent synergistic effect, with bacteria cells preferentially associated to hyphal forms. In general, the dual biofilms showed an evolutive behavior over time in terms of number of cells, metabolic activity, and total biomass. Furthermore, when C. albicans, MSSA, and MRSA were in a co-culture, both SAP and PL-C enzymes were produced, which may suggest an increased severity of dual biofilms. Although it is unlikely that the specific resistance mecha-nisms to antibiotics of MRSA (presence of mecA gene) would influence the Candida-bacteria interactions, it is important to highlight that other factors determining the difference between MRSA and MSSA strains must exist, and should be further investigated, excluding differences in drug resistance mechanisms. In fact, our results showed some significant differences be-tween bacteria biofilms and their combination with C. albicans. This indicates that, despite both bacterial populations are virulent, the mechanisms of pathogenesis of MRSA and MSSA infections may differ at some degree. With that in mind, this study contributed to the under-standing of the complex interactions between microbial species, which would provide a new perspective for developing new strategies for the prevention, control and treatment of polymi-crobial infections. The identification of potential targets for the inhibition of co-adhesion,

biofilm development, and enzymes secretion may ultimately provide the means to modify mi-crobial colonization and infection, reducing the impact of polymicrobial diseases on human health.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CEV CEZ SS. Performed the experiments: CEZ SS CMID VBL. Analyzed the data: CEV CEZ PVS PAB SS. Contributed reagents/materials/analy-sis tools: PAB. Wrote the paper: CEZ SS PVS CEV.

References

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent in-fections. Science 284: 1318–1322. PMID: 10334980
2. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. (2001) Antifungal re-sistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res 80: 903–908. PMID: 11379893
3. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. (2011) Candida spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 111: 726–733. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.033 PMID: 21569989
4. Abe S, Ishihara K, Okuda K (2001) Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of el-derly patients and effects of professional oral care. Arch Gerontol Geriatr 32: 45–55. PMID: 11251238
5. Harriott MM, Noverr MC (2009) Candida albicans and Staphylococcus aureus form polymicrobial bio-films: effects on antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Ch 53: 3914–3922. doi: 10.1128/AAC. 00657-09 PMID: 19564370
6. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, et al. (1999) High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 34: 281–286. PMID: 10459478
7. Smith AJ, Brewer A, Kirkpatrick P, Jackson MS, Young J, Watson S, et al. (2003) Staphylococcal spe-cies in the oral cavity from patients in a regional burns unit. J Hosp Infect 55: 184–189. PMID: 14572485
8. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W (2007) Interspecies interactions within oral microbial communities. Microbiol Mol Biol Rev 71: 653–670. PMID: 18063722
9. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP (2006) Effect of oral bacteria on growth and survival of Candida albicans biofilms. Arch Oral Biol 51: 672–680. PMID: 16620775
10. Baena-Morroy T, Sancheź -Vargas LO, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B (2004) Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. Oral Medicine and Pathology 10: 27–39.
11. Carlson E (1983) Effect of strain of Staphylococcus aureus on synergism with Candida albicans result-ing in mouse mortality and morbidity. Infect Immun 42: 285–292. PMID: 6352497
12. Harriott MM, Noverr MC (2010) Ability of Candida albicans mutants to induce Staphylococcus aureus vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. Antimicrob. Agents Chemother 54: 3746–3755. doi: 10.1128/AAC.00573-10 PMID: 20566760
13. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitan-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO (2012) Formation and quantification assay of Candida albicans and Staphylococcus aureus mixed biofilm. Rev Iberoam Micol 29: 214–222. doi: 10.1016/j.riam.2012.02.003 PMID: 22391328
14. Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME (2010) Microbial interac-tions and differential protein expression in Staphylococcus aureus-Candida albicans dual-species bio-films. FEMS Immunol Med Microbiol 59: 493–503. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00710.x PMID: 20608978
15. Carlson E, Johnson G (1985) Protection by Candida albicans of Staphylococcus aureus in the estab-lishment of dual infection in mice. Infect Immun 50: 655–659. PMID: 3905609
16. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA (2009) Cross-kingdom interactions: Candida albicans and bac-teria. FEMS Microbiol Lett 299: 1–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x PMID: 19552706
17. Faix RG and Kovarik SM (1989) Polymicrobial sepsis among intensive care nursery infants. J. Perinatol 9: 131–136. PMID: 2738721
18. Calderone RA, Fonzi WA (2001) Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol 9: 327–335. PMID: 11435107

19. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN (2007) Polymicrobial bloodstream infections involv-ing Candida species: analysis of patients and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis 59: 401–406. PMID: 17888612

20. Chadwick PR (1999) Revised UK guidelines for the control of methicillin-resistant Staphylococcus au-reus in hospitals. Int J Antimicrob Agents 11: 89–91. PMID: 10221410

21. Palavecino E (2004) Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Clin Lab Med 24: 403–418. PMID: 15177847

22. Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. Clinical Infectious Diseases 46: 359–59.

23. Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, et al. (2012) Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. Microbiology 158: 2975–86. doi: 10.1099/mic.0.062109-0 PMID: 22918893

24. National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) report, data summary from January 1990-May 1999. Am J Infect Control (1999) 27: 520–532. PMID: 10586157

25. Mylotte J (2002) Nursing home-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 35: 1205–1211. PMID: 12410480

26. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ (2001) Aspiration pneu-monia: dental and oral risk factors in an older veteran population. J Am Geriatr Soc 49: 557–563. PMID: 11380747

27. Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, et al. (2014) In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans Candida species isolated from patients with oral candidia-sis with or without diabetes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 118: 84–91. doi: 10.1016/j. oooo.2014.03.020 PMID: 24908598

28. Sanitá PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE (2014) Enzymatic activity pro-file of a Brazilian culture collection of Candida albicans isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. Mycoses 57: 351–7. doi: 10.1111/myc.12162 PMID: 24329754

29. Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, et al. (2015) Systemic Staphy-lococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue. Microbiolo-gy. 161: 168–81. doi: 10.1099/mic.0.083485-0 PMID: 25332378

30. Hua X, Yuan X, Mitchell BM, Lorenz MC, O'Day DM, Wilhelmus KR (2009) Morphogenic and genetic differences between Candida albicans strains are associated with keratomycosis virulence. Mol Vis. 15: 1476–84. PMID: 19649176

31. O'Day DM, Head WS, Csank C, Shetlar DJ, Robinson RD, McCollum GW, et al. (2000) Differences in virulence between two Candida albicans strains in experimental keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 41: 1116–21. PMID: 10752949

32. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 40: 175–9. PMID: 10699673

33. Altieri KT, SanitáPV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE (2012) Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus. JADA 143: 270–277. PMID: 22383208

34. Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, Machado AKS, Junqueira JC, Jorge AO (2011) Susceptibility of Candida albicans, Staphylococcus aureus, and Streptococcus mutans biofilms to photodynamic inacti-vation: an in vitro study. Lasers Med Sci 26: 341–348. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3 PMID: 21069408

35. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J (2010) In Vitro Biofilm Activity of Non-Candida albicans Candida Species. Curr Microbiol 61: 534–540. doi: 10.1007/s00284-010-9649-7 PMID: 20401483

36. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J (2009) Biofilms of non-Candida albi-cans Candida species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol 47: 681–689. doi: 10.3109/13693780802549594 PMID: 19888800

37. Roveta S, Marchese A, Schito GC (2008) Activity of daptomycin on biofilms produced on a plastic sup-port by Staphylococcus spp. Int J Antimicrob Agents 31: 321–8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.11.012 PMID: 18201873

38. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S (2009) Comparison of biofilm-associated cell sur-vival following in vitro exposure of meticillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Int J Antimicrob Agents 33: 374–8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.08.029 PMID: 19101124

39. Al-Fattani MA and Douglas LJ (2006) Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemi-cal composition and role in drug resistance. J. Med Microbiol 55: 999–1008. PMID: 16849719

40.

40. Ramage G, VandeWalle K, López-Ribot JL, Wickes BL (2002) The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans. FEMS Microbiol Lett 214: 95–100. PMID: 12204378

41. Bamford CV, D'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF (2009) Streptococcus gordonii modulates Candida albicans biofilm formation through intergeneric communication. Infect Immun 77: 3696–3704. doi: 10.1128/IAI.00438-09 PMID: 19528215

42. Peters BM, Noverr MC (2013) Candida albicans-Staphylococcus aureus Polymicrobial Peritonitis Mod-ulates Host Innate Immunity. Infection and Immunity 81: 2178–2189. doi: 10.1128/IAI.00265-13 PMID: 23545303

43. Lyon JP, Resende MA (2006) Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in Candida albicans obtained from denture wearers. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 102: 632–8. PMID: 17052640

44. Rajendran R, Robertson DP, Hodge PJ, Lappin DF, Ramage G (2010) Hydrolytic enzyme production is associated with Candida albicans biofilm formation from patients with type I diabetes. Mycopathologia 170: 229–35. doi: 10.1007/s11046-010-9319-0 PMID: 20512529

45. Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, et al. (1995) Degradation of humoral host defense by Candida albicans proteinase. Infect Immun 63: 984–988. PMID: 7868271

46. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N (2004) Interactions of Candida albicans with other Candida spp. and bacteria in the biofilms. J. Appl. Microbiol 96: 1067–73. PMID: 15078523

47. Hube B (1996) Candida albicans secreted aspartyl proteases. Curr Top Med Mycol 1: 55–69. PMID: 9504059

48. Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, et al. (1999) In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect Immun 67: 2482–2490. PMID: 10225911

49. Salyers A, Witt D (1994) Virulence factors that damage the host. In: Salyers A & Witt D, editors. Bacteri-al Pathogenesis: a Molecular Approach. Washington, DC: ASM Press.

50. Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 13: 122–143. PMID: 10627494

51. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter S (2006) In vitro evaluation of virulence attributes of Candida spp. isolated from patients affected by diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol 21: 183–189. PMID: 16626376

52. Pande M, Dubey VK, Yadav SC, Jagannadham MV (2006) A novel serine protease cryptolepain from Cryptolepis buchanani: purification and biochemical characterization. J Agric Food Chem 54: 10141– 10150. PMID: 17177552

53. Taniguchi L, de Fatima Faria B, Rosa RT, de Paula E Carvalho A, Gursky LC, Elifio-Esposito SL, et al. (2009) 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 78: 171–174. doi: 10.1016/j.mimet.2009.05.012 PMID: 19464327

54. Bosco VL, Birman EG, Cury AE, Paula CR (2003) Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and anti-fungal resistance. Pesqui Odontol Bras 17: 217–222. PMID: 14762498

55. D'EcąA Júnior, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, de Maria Silva Figueiredo P, de Andrade Monteiro C (2011) In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of Candida. Rev Soc Bras Med Trop 44: 334–338. PMID: 21901875

56. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI, Azeredo J, Oliveira R (2010) Examination of potential virulence factors of Candida tropicalis clinical isolates from hospitalized patients. Mycopathologia 169: 175–182. doi: 10.1007/s11046-009-9246-0 PMID: 19851885

57. Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH (2008) Correlation between en-zyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in Candida species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. J Oral Pathol Med 37: 587–592. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00687.x PMID: 18764856

58.

Araraquara, 04 de Janeiro de 2017.

_____

Aluna: Virgínia Barreto Lordello

De acordo:

_____

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros