



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

NÁDIA DOMINGUES

**BIOFILMES MULTIESPÉCIES DE *Candida albicans*
ASSOCIADOS COM *Streptococcus mitis* E *Streptococcus*
sanguinis: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

2014

NÁDIA DOMINGUES

**BIOFILMES MULTIESPÉCIES DE *Candida albicans* ASSOCIADOS
COM *Streptococcus mitis* E *Streptococcus sanguinis*: ESTUDO *IN*
VITRO E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientador: Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge
Coorientadora: Prof^a Dra. Cristiane Aparecida Pereira Correia

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Domingues, Nádia

Biofilme multiespécies de *Candida albicans* associado com
Streptococcus mitis e *Streptococcus sanguinis*: estudo in vitro e in
vivo / Nádia Domingues. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge

Co-orientadora: Cristiane Aparecida Pereira Correia.

1. Biofilme. 2. *Candida albicans*. 3. *Streptococcus mitis*. 4.
Streptococcus sanguinis. 5. *Galleria mellonella*. I. Jorge, Antonio
Olavo Cardoso, orient. II. Correia, Cristiane Aparecida Pereira, co-
orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual
Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual
Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 17 de dezembro de 2014

E-mail: nadia.domingues@ict.unesp.br

Assinatura: _____



BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus São José dos Campos

Prof^a Dra. Silvia Maria Rodrigues Querido

Faculdade de Pindamonhangaba

FAPI – Faculdade de Pindamonhangaba

Campus Pindamonhangaba

Prof^a Dra. Luciane Dias de Oliveira

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 17 de dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo amor incondicional que alimenta minha fé, fazendo dos obstáculos aprendizagem e das oportunidades conquistas.

Aos meus queridos e amados pais, Jarbas e Marlene, por todo carinho, dedicação e apoio durante todos os momentos de minha vida.

À minha querida amada filha, Maria Fernanda, amor da minha vida, pela paciência compreensão pelos momentos de ausência e companheirismo.

Aos meus queridos irmãos Juliano, Camila e Marcelo, por toda ajuda, amor, carinho, amizade e pela importância em minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientado Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Agradeço por me receber no Laboratório de Microbiologia, ajudando e acreditando em meu desenvolvimento e crescimento profissional e pessoal. Sua dedicação, ensinamentos e serão guardados sempre. Minha gratidão, admiração e respeito pela pessoa e profissional que o senhor é.

À co-orientadora e amiga Prof^a Dra. Cristiane Ap. Pereira Correia

Agradeço pela aprendizagem, dedicação, paciência e palavras de incentivo. Minha eterna gratidão, admiração e amizade sempre.

À querida Prof^a Dra Priscila Christiane Susy Liporone

Meu imenso agradecimento por acreditar e apoiar em minhas escolhas profissionais, por todo ensinamento carinho e dedicação. Minha admiração, respeito e amizade sempre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

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

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

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

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós Graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka e Ivan Oliveira Damasceno pela ajuda durante este tempo.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio e Domingos Agradeço por toda ajuda e dedicação, essenciais para o bom andamento de minha pesquisa.

À Profª Dra. Luciane Dias de Oliveira pela disponibilidade, apoio, dedicação e amizade. Minha admiração e carinho.

À Profª Dra. Graziella Nuernberg Back-Brito pelo carinho e dedicação. Minha admiração e amizade. .

Às minhas queridas e amadas tias, Agueda Maria e Maria Angélica, por todo apoio e ajuda em toda minha vida. Meu carinho e gratidão

À amada amiga Alessandra Paes de Barros, Ariane de Cássia Ribeiro de Carvalho e Camila Mendes Matheus, pela amizade, carinho, ajuda nos momentos difíceis, apoio e confiança.

Aos queridos amigos conquistados, Anna Carolina Borges Pereira da Costa, Adeline Lacerda Jorjão, Ana Carolina Chipoletti, Eduardo de Oliveira, Mirian Marcolan, Michele Peneluppi, Rafaella Braga, Tamara Carneiro pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório Marisol, Isabella, Jonatas, Felipe Camargo, Fernanda Freire, Fernanda Tomé, Patrícia, Leiliane, Rodnei, Júnia, Simone, Elis, Kely e aos demais colegas pelo companheirismo e convivência durante o curso.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e
sim a caminhada. Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Micro-organismos e padronização das cepas padronizadas	25
4.1.1 Formação dos biofilmes isolados e associados de <i>C. albicans</i> ...	26
4.1.2 Formação dos biofilmes de <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i> isolados	27
4.1.3 Determinação de Unidades formadoras de colônias – UFC	27
4.2 Atividade metabólica	28
4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	29
4.4 Interação entre <i>C. albicans</i> com <i>S. mitis</i> e <i>S. sanguinis</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	30
4.4.1 Determinação das concentrações microbianas subletais	30
4.4.2 Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	31
4.5 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	47
8 REFERÊNCIAS	48

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

RESUMO

Streptococcus sanguinis e *Streptococcus mitis* são colonizadores pioneiros do biofilme bucal e podem causar endocardite bacteriana. *Candida albicans* está presente na cavidade bucal de forma comensal, possui capacidade de formar biofilme e causar candidose bucal. O objetivo desse trabalho foi avaliar as interações entre *C. albicans* com *S. sanguinis* e *S. mitis* em biofilmes e suas influências *in vivo* em modelo experimental de invertebrado *Galleria mellonella*. Para o estudo da interação de *C. albicans* (ATCC 18804) com *S. sanguinis* (ATCC 7073) e *S. mitis* (ATCC 4945) foram formados biofilmes monoespécie e multiespécies de *C. albicans* com os micro-organismos (na concentração de 10^7 células/mL) em fundo de placa de 96 poços por 48 h, incubados em estufa a 37 °C com 5% CO₂. Após crescimento, os biofilmes foram desprendidos e obtidas diluições decimais as quais foram semeadas em meios seletivos. Após incubação por 48 h/37 °C foi obtida a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Em paralelo, foram realizados ensaios colorimétricos com o sal XTT, a fim de mensurar a atividade metabólica de *C. albicans* nos biofilmes isolados e associados, seguindo de leitura a 492 nm, e o resultado expresso em absorbância (Abs). No estudo *in vivo*, primeiro foram determinadas as concentrações subletais dos micro-organismos, e inoculadas em *G. mellonella*, e observado o efeito de *C. albicans*, *S. mitis* e *S. sanguinis* nas lagartas, avaliando se curva de sobrevivência. Avaliação morfológica dos biofilmes foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados de contagem de UFC/mL e da atividade metabólica foram submetidos à análise de normalidade, e como foi observada distribuição normal, os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes t de *Student* (para duas variáveis) e *Tukey* (para três ou mais variáveis), considerando-se diferença estatística quando $p < 0,05$. Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisados pelo método de *Log-rank*. Os estreptococos influenciaram na redução dos biofilmes de *C. albicans*, sendo os percentuais de redução, respectivamente para UFC/mL e Abs de: 60,3% e 23,0% quando associado com *S. mitis*; e, 66,3% e 48,4% na associação com *S. sanguinis*. As ilustrações por MEV

demonstraram diminuição de células leveduriformes (bastoconídeos) e hifas nos biofilmes multiespécie de *C. albicans*. No estudo *in vivo* com *G. mellonella*, os grupos isolados apresentaram um percentual de morte de lagartas de 43,75% para *C. albicans*; 12,5% para *S. mitis*; e 18,75% para *S. sanguinis*. Nas associações os percentuais de morte foram de: 12,5% para *C. albicans* e *S. mitis*; e 18,75% para *C. albicans* e *S. sanguinis*. Concluiu-se que em biofilme, *S. mitis* e *S. sanguinis* apresentaram uma resposta antagonista ao crescimento de *C. albicans*, diminuindo sua viabilidade tanto na contagem de UFC/mL, como na mensuração da atividade metabólica da levedura. *S. mitis* e *S. sanguinis* foram favorecidos com a presença de *C. albicans*, apresentando maior crescimento em biofilmes associados. No estudo *in vivo* de *G. mellonella*, a infecção por *C. albicans* isolada foi mais patogênica do que os demais grupos, sendo que *S. mitis* e *S. sanguinis* apresentaram uma possível inibição da patogenicidade de *C. albicans*.

Palavras-chave: Biofilme. *Candida albicans*. *Galleria mellonella*. *Streptococcus mitis*. *Streptococcus sanguinis*.

Domingues N. Multi-species biofilms of *Candida albicans* associated with *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis*: a study in vitro and in vivo [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Streptococcus sanguinis and *Streptococcus mitis* are pioneering colonizers of oral biofilm and can cause bacterial endocarditis. *Candida albicans* is present in the oral cavity in a commensal manner and also has the ability to form biofilm and cause oral candidiasis. The aim of this study was to evaluate the interactions between *C. albicans* with *S. sanguinis* and *S. mitis* biofilms and their influences in vivo on an experimental invertebrate model of *Galleria mellonella*. To study the interaction of *C. albicans* (ATCC 18804) with *S. sanguinis* (ATCC 7073) and *S. mitis* (ATCC 4945) monospecies and multispecies biofilms were formed of *C. albicans* and with micro-organisms (a concentration of 10^7 cells/ml) in the bottom of a 96-well plate for 48 h, incubated at 37 °C with 5% CO₂. After growth, biofilms were detached, and decimal dilutions were plated on selective media. After incubation for 48 h/37 °C the count of colony forming units per milliliter (CFU/mL) was obtained. Alongside, XTT salt colorimetric assays were carried in order to measure the metabolic activity of isolated and associated *C. albicans* biofilms, following reading at 492 nm, and the result expressed in absorbance (Abs). In the in vivo study, first the sublethal concentrations of microorganisms were determined, and inoculated into *G. mellonella*, and the effect of *C. albicans*, *S. mitis* and *S. sanguinis* in caterpillars was observed, evaluating the survival curve. Morphological evaluation of the biofilms was performed by scanning electron microscopy (SEM). The count of CFU/mL and metabolic activity were submitted to normality analysis, and as a normal distribution was observed, the results were statistically analyzed by Student's t test (for two variables) and Tukey (for three or more variables) considering statistical difference at $p < 0.05$. The *G. mellonella* survival curves data were analyzed by log-rank method. Streptococci influenced the reduction of biofilms of *C. albicans*, and the percentage of reduction, respectively for CFU/mL and Abs: 60.3% and 23.0% when associated with *S. mitis*; and 66.3% and 48.4% in association with *S. sanguinis*. SEM Illustrations showed a reduction of yeast cells (blastospores) and hyphae in multispecies biofilms of *C. albicans*. The in vivo study with *G. mellonella*,

isolated groups showed a percentage of caterpillars death of 43.75% for C. albicans; 12.5% for S. mitis; and 18.75% S. sanguinis. In the associations the percentages of death were: 12.5% for C. albicans and S. mitis; and 18.75% for C. albicans and S. sanguinis. It was concluded that in the biofilm, S. mitis and S. sanguinis showed an antagonistic response to the growth of C. albicans, reducing its viability both in number of CFU/ml as the measurement of the metabolic activity of the yeast. S. mitis and S. sanguinis were favored with the presence of C. albicans, showing higher growth in biofilms associated. In this vivo study of G. mellonella, the infecton by C. albicans isolated was more pathogenic than the other groups, so that S. mitis and S. sanguinis showed possible inhibition of C. albicans pathogenicity.

Keywords: Biofilm. Candida albicans. Galleria mellonella. Streptococcus mitis. Streptococcus sanguinis.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um hábitat complexo que abriga mais de 750 espécies bacterianas diferentes (Redanz et al., 2011). Muitas dessas espécies são consideradas como membros da microbiota residente, vivendo em comensalismo em relação aos outros micro-organismos e a seu hospedeiro (Jenkinson, Lamont, 2005; Redanz et al., 2011). A cavidade bucal promove vantagens para os micro-organismos participantes, que incluem amplo hábitat para crescimento, maior resistência a agentes antimicrobianos e resistência aos agentes de defesa do hospedeiro (Thomas, Nakaishi, 2006).

Biofilme é definido como uma comunidade microbiana embebida por uma matriz extracelular aderida em uma superfície biótica ou abiótica (Jakubovics, Kolenbrander, 2010). As interações entre as espécies bacterianas bucais, desde as fases iniciais de colonização e de formação do biofilme supragengival e subgengival maduros, fazem desses micro-organismos os principais agentes etiológicos de doenças bucais infecciosas, tais como cárie dentária, gengivite e periodontite (Pereira et al. 2011; Kang et al., 2011; Zoumpopoulou et al., 2013).

Durante a formação do biofilme, os micro-organismos pioneiros proporcionam uma nova superfície, metabólitos adequados ou outros sinais para a fixação de micro-organismos sucessores no biofilme (Lamont et al., 2002; Jenkinson, Lamont, 2005; Ge et al., 2008). A comunidade de micro-organismos pioneiros do biofilme é formada principalmente por estreptococos orais (Jenkinson, Lamont, 2005; Okahashi et al., 2011) entre eles *Streptococcus sanguinis* (anteriormente

S. sanguis) e *Streptococcus mitis*, pertencentes ao grupo *viridans* (Yamaguchi et al; 2006), e foco deste estudo.

S. sanguinis é a primeira espécie bacteriana a colonizar a superfície dos dentes e está intimamente relacionado à endocardite infecciosa, que é frequentemente causada por bactérias orais que são vinculadas pela circulação sanguínea após traumas (Yamaguchi et al., 2006; Jakubovics et al., 2014).

S. mitis coloniza praticamente todas as superfícies da cavidade bucal, incluindo dentes, língua, superfícies da mucosa, tonsilas e nasofaringe (Aas et al., 2008). É também um dos estreptococos orais mais comuns associados à endocardite (Levitz, 1999; Sabella et al., 2001; Rukke et al., 2012).

O estabelecimento e a manutenção da microbiota bucal estão relacionados não só com a coagregação bacteriana, mas também com as interações destas bactérias com leveduras como *Candida albicans* (Nikawa et al., 2003; Vasconcelos et al., 2006). Estudos referentes ao isolamento de *C. albicans* de biofilme dentário, demonstraram que esta espécie de levedura não está associada apenas ao desenvolvimento de candidose oral, mas também com a patogênese da cárie dentária e da doença periodontal (Järvensivu et al., 2004; Pereira et al., 2011).

Sabendo que esses micro-organismos vivem no mesmo hábitat e que podem causar doenças humanas são necessários mais pesquisas envolvendo as interações entre *C. albicans* com *S. sanguinis* e com *S. mitis* em biofilmes, avaliando a patogenicidade desta interação, para um maior entendimento dessa associação e uma possível obtenção de terapias mais eficientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Biofilmes são estruturas tridimensionais, compostas por comunidades microbianas bem organizadas e cooperativas, ligadas a uma superfície sólida e incorporadas por matriz de polissacarídeos extracelulares que promovem a adesão de micro-organismos às superfícies (Marsh P, Martin, 2004; Zijng et al., 2010) bióticas e abióticas na natureza (Thomas, Nakaishi, 2006). O biofilme pode ser composto por espécies bacterianas únicas ou múltiplas, comensais ou patogênicas (Mah, O'Toole, 2001).

Micro-organismos presentes no biofilme humano são essenciais para a manutenção da saúde do hospedeiro, tal como produzir vitaminas e aminoácidos essenciais e prevenir a colonização por patógenos exógenos (Marsh PD, 2010; Dufour et al., 2012). Por outro lado, se ocorrer uma desordem no organismo os micro-organismos comensais do biofilme podem se tornar patogênicos. A maior parte das infecções hospitalares está relacionada com biofilme, pois colonizam dispositivos médico implantados, como respiradores, cateteres venosos, próteses valvulares, dispositivos ortopédicos e outros (Dufour et al., 2012).

A cavidade bucal é um ambiente propício para colonização e crescimento de grande quantidade de micro-organismos, sendo em sua maioria benéficos e que vivem em harmonia com o hospedeiro (Marsh PD, 2010). A presença de tecidos duros (dentes) e moles (mucosa e língua) em que cada estrutura apresenta anatomia complexa (Jakubovics et al., 2014), além da abundância de nutrientes, umidade, temperatura do hospedeiro, cria condições que favorecem a colonização por diversos micro-organismos (Dufour et al., 2012), tornando

a cavidade bucal um ambiente ideal para o desenvolvimento do biofilme (Thomas, Nakaishi, 2006).

A colonização de micro-organismos em todas as superfícies acessíveis da boca é natural e essencial para o desenvolvimento normal da fisiologia da cavidade bucal (Marsh PD, 2010). O biofilme formado em superfícies duras, como os dentes, apresenta-se normalmente com várias camadas de células bacterianas e pode chegar a centenas de micrometros de espessura. Por outro lado, a colonização bacteriana em tecido mole, como o tecido gengival, apresenta-se como uma estrutura em monocamada bacteriana, pois as células epiteliais estão em constante descamação e substituição pelo hospedeiro, regulando a adesão das bactérias (Kolenbrander, 2000).

Quando os micro-organismos estão organizados em biofilme podem se tornar até mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos que células planctônicas (Zhang, Mah, 2008). A resistência aos antibióticos que ocorre no biofilme é expressa pelo contato célula-célula, através do *quorum sensing*, levando a comunidade microbiana a expressar diversos fenótipos de virulência, imunomodulação ou a combinação de ambos que neutralizam a ação dos fármacos (Li YH, Tian, 2012). Os habitantes do biofilme são continuamente submetidos a desafios ambientais na cavidade bucal, incluindo variações na disponibilidade de oxigênio e nutrientes, alterações de pH e propriedades antimicrobianas da saliva (Nobbs et al., 2009; Wright et al., 2013). Quando os micro-organismos não conseguem se fixar a superfície ou aderir aos colonizadores iniciais, são sujeitos a eventual deslocamento através do fluxo salivar e outras forças mecânicas de remoção (Wright et al., 2013).

O processo de formação do biofilme se inicia com algumas espécies de bactérias orais, conhecidas como colonizadores iniciais ou pioneiros; *Streptococcus gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *Neisseria* e *Actinomyces*; que se aderem a um revestimento na

superfície dos dentes denominada película adquirida (Marsh P, Martin, 2004; Dufour et al., 2012). A película adquirida é uma camada membranosa amorfa que recobre a superfície do esmalte dentário, inicialmente livre de bactérias (Jorge, 2012), composta por albumina, glicoproteínas, proteínas ricas em prolina, mucinas e outros componentes (Kreth et al., 2009; Mancl et al., 2013). Após aderência, a comunidade pioneira se multiplica, formando microcolônias que ficam revestidas por glicoproteínas, polissacarídeos extracelulares e proteínas salivares, criando condições para a colonização de bactérias mais exigentes, os colonizadores intermediários, que se ligam aos colonizadores primários alterando ainda mais a morfologia do biofilme (Marsh P, Martin, 2004). No biofilme supragengival predominam bactérias Gram-positivas, enquanto que o subgengival é formado principalmente por espécies Gram-negativas e anaeróbias (Dufour et al; 2012). Com o estabelecimento da comunidade clímax, com alta diversidade microbiana, aumenta o potencial de cooperação metabólica e as interações entre os membros da comunidade (Kolenbrander et al., 2006).

As doenças que frequentemente acometem a cavidade bucal são cárie dentária e doença periodontal, sendo que ambas decorrem diretamente da ação do biofilme bucal (Jakubovics et al., 2014). A cárie dentária é uma doença multifatorial de origem microbiana, que se caracteriza pela desmineralização do esmalte dos dentes resultante da conversão de carboidratos da dieta em ácidos que resulta principalmente na proliferação de estreptococos do grupo *mutans*. No entanto, a doença periodontal é causada em sua maior parte, pela infecção de bactérias específicas Gram-negativas mediadas por uma resposta agressiva do hospedeiro, levando a destruição do tecido conjuntivo, ligamento periodontal e osso alveolar (Zoumpopoulou et al., 2013; Jakubovics et al., 2014).

Os estreptococos são importantes membros do biofilme bucal, fermentam carboidratos e possuem a capacidade de colonizar

inicialmente as superfícies dos dentes cobertas com a película adquirida o que permite a colonização subsequente de outras espécies de micro-organismos bucais (Zheng et al., 2011). A interação microbiana entre os estreptococos e outras bactérias orais desempenha um papel crítico no desenvolvimento de comunidades microbianas, além de manter o equilíbrio entre a saúde e a doença do hospedeiro (Dufour et al., 2012).

Pertencentes aos grupos *viridans* α -hemolítico e *mitis* de estreptococos, *S. sanguinis* e *S. mitis* são os principais habitantes da microbiota comensal da cavidade bucal e trato respiratório superior de seres humanos (Yamaguchi et al., 2006; Okahashi et al., 2014). Estes estreptococos são micro-organismos anaeróbios facultativos, Gram-positivos (Evans et al., 2014), crescem em cadeias, e são bactérias predominantes no biofilme dentário supra e subgengival, apresentando-se em maior quantidade nas cavidades bucais de indivíduos saudáveis (Renvert et al., 2006; Tu et al., 2012).

Uma das características que contribui para a patogenicidade dos membros do grupo *mitis* de estreptococos é a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substância que possui um efeito citotóxico importante para competição bacteriana em biofilmes, inibindo o crescimento de outras bactérias, incluindo *Streptococcus mutans* (Zhu, Kreth, 2010; Fujishima et al., 2013; Jakubovics et al., 2014; Okahashi et al., 2014).

Assim como os outros estreptococos pertencentes ao grupo *mitis*, *S. sanguinis* e *S. mitis* são considerados importantes na fase inicial do desenvolvimento do biofilme e representam mais de 80% dos micro-organismos nesta fase (Duran-Pinedo et al., 2014; Jakubovics et al., 2014). Estes estreptococos possuem adesinas para receptores de película salivar e bactérias, formando uma ligação que facilita a colonização de espécies que não possuem a capacidade de se aderir facilmente à película adquirida (Jakubovics et al., 2014). Também podem atuar como “patógenos acessórios”, aumentando a virulência do biofilme

misto (Xu et al., 2013). Além disso, foi demonstrado aumento na inflamação da mucosa, infecção invasiva e disseminação sistêmica da associação do grupo *mitis* com *C. albicans* em camundongos imunodeprimidos (Ricker et al., 2014).

S. sanguinis está intimamente relacionado com endocardite infecciosa (Douglas CWI et al., 1993; Evans et al., 2014), que é causada por bactérias orais que são vinculadas pela corrente sanguínea (Yamaguchi et al., 2006). Como a maioria dos estreptococos orais, *S. sanguinis* produz alfa-hemólise em ágar sangue, uma característica relacionada aos membros do grupo *viridans* pela alteração da hemoglobina por um sistema oxidorreduzidor contido na célula bacteriana (Facklam, 2002; Jorge, 2012). Tem sido demonstrado que indivíduos livres de cárie apresentam um número significativamente maior de *S. sanguinis*, comparado com indivíduos com cárie (Zheng et al., 2011). Isso ocorre também na doença periodontal, o que indica que a presença desse micro-organismo pode ser inibidor tanto para periodontite quanto para cárie dentária (Jakubovics et al., 2014).

S. mitis coloniza praticamente todas as superfícies da cavidade bucal, incluindo dentes, língua, superfícies das mucosas bem como tonsilas e nasofaringe (Aas et al., 2008). Considerado como um dos primeiros colonizadores da superfície dental pode ser detectado em números elevados tanto na formação inicial do biofilme como em lesões de cáries incipientes (Schlafer et al., 2012). *S. mitis* é um dos micro-organismos mais abundantes na microbiota oral saudável, e qualquer diminuição em números teria um impacto no estado de saúde do biofilme oral (Duran-Pinedo et al., 2014). Entretanto, estudos têm demonstrado que *S. mitis* como outras espécies de estreptococos também exibem propriedades acidogênicas e acidúricas, pois possui uma capacidade variável de formar pequena quantidade de polissacarídeo extracelular (glicano) (Uzeda, 2002), sendo capazes de criar um ambiente cariogênico (Schlafer et al., 2011). *S. mitis* é um dos estreptococos orais mais

associados com uma variedade de complicações infecciosas incluindo endocardite infecciosa, bacteriemia e septicemia (Levitz, 1999; Sabella et al., 2001; Okahashi et al., 2014). Recentemente, o câncer de pâncreas tem sido associado a *S. mitis*, aumentando a relevância clínica deste grupo de estreptococos (Park HK et al., 2012).

C. albicans é um fungo dimórfico que podem existir em três morfotipos: leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. A capacidade de mudar da forma de levedura para forma de hifas é importante em diversos processos, tais como virulência (Kumamoto, Vines, 2005; Han et al., 2011; Jacobsen et al., 2012) e formação de biofilme (Douglas LJ, 2003; Krueger et al., 2004; Jarosz et al., 2009). A forma filamentosa (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) promove adesão mais firme às células epiteliais e tecidos do hospedeiro, favorecendo a invasão e provocando danos ao hospedeiro (Borghi et al., 2014). *C. albicans* é isolada frequentemente de vários sítios bucais, incluindo língua, mucosa jugal, palato, biofilme dental, microbiota subgengival, lesões de cárie e materiais restauradores (Järvensivu et al., 2004).

Encontrado na cavidade bucal de 50 a 60% de pacientes saudáveis, *C. albicans* pode causar amplo espectro de doenças como candidose, em superfícies bucais, na pele e sistêmica (Ramage et al., 2005; Pereira et al., 2011; Costa et al., 2013). A candidose ocorre com frequência em pacientes imunologicamente comprometidos, submetidos a tratamentos prolongados (Hsu et al., 2013), como pacientes com AIDS, hipossalivação, diabetes mellitus, pacientes tratados com terapias antibióticas e imunossupressoras para tratamento do câncer e pessoas com má higienização bucal (Ishijima et al., 2012). Quando levedura está associada a estreptococos orais apresenta em biofilme humano, a formação de estruturas semelhantes a “espiga de milho” em torno das hifas de *C. albicans* (Xu et al., 2013; Ricker et al., 2014). *C. albicans* apresenta capacidade de colonizar hidroxiapatita, como *S. mutans*, mas utilizando diferentes mecanismos, e possui capacidade de dissolver este

material *in vitro* em ritmo maior quando comparados com *S. mutans* (Vasconcelos et al., 2006).

A formação de biofilme é o maior obstáculo para o tratamento de infecções provocadas por *Candida*, pois estas estruturas apresentam diferentes características fenotípicas do que espécies planctônicas correlatas. (Junqueira et al., 2012; Hsu et al., 2013). No biofilme, todas as morfologias de *C. albicans* são encontradas: blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas são incorporados em uma matriz extracelular (Borghi et al., 2014), além de apresentar sensibilidade reduzida aos agentes antifúngicos e proteção do sistema imune, o biofilme não só oferece proteção física contra antimicrobianos, como também as células em biofilme tornam-se intrinsecamente resistentes aos medicamentos, isso ocorre pelo estado metabólico alterado que essa estrutura lhe confere (Fox, Nobile, 2012; Cirasola et al., 2013; Hsu et al., 2013). A aplicação de técnicas genéticas moleculares tem sido empregada para auxiliar na identificação de genes responsáveis pela virulência de *C. albicans* (Fonzi, Irwin, 1997). Nailis et al. (2006) demonstraram que cerca de 5% de todos os genes de *C. albicans* são expressos de forma diferente em biofilmes em comparação com cultura de células na fase planctônica.

O uso de animais vertebrados como modelos experimentais de infecção para o estudo da virulência de um patógeno ou a eficácia terapêutica de um medicamento, como a interação hospedeiro-patógeno, já vem sendo usada há muito tempo. Mas, sua utilização implica em algumas desvantagens, como a submissão e aprovação do comitê de ética, local apropriado para instalação dos animais, a restrição quanto ao número de animais utilizados, como também um custo elevado com manutenção dos animais (Cirasola et al., 2013; Nathan, 2014). Em contra partida, modelos de invertebrados têm sido muito utilizados como meio alternativo para o estudo da patogenicidade de micro-organismos, incluindo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e a lagarta

Galleria mellonella (insecta, Lepidoptera, *Galleridae*) como hospedeiro (Jacobsen, 2014).

G. mellonella (conhecida como a traça maior da cera), diferentemente dos animais vertebrados, apresentam um custo de manutenção mais reduzido em relação a outros animais, o que permite o uso de uma quantidade maior de animais. O tamanho relativamente grande das lagartas é de fácil manuseio, facilita a injeção padronizada inóculo (processo feito sem anestesia), é eticamente aceitável (Cirasola et al., 2013; Harding et al., 2013; Borghi et al., 2014; Jacobsen, 2014). As lagartas podem ser mantidas a temperatura de 37 °C, sendo esta característica muito importante, pois é a temperatura em que os micro-organismos apresentam condições ideais de patogenicidade ao hospedeiro humano, além de permitir uma rápida avaliação da eficácia e toxicidade de agentes *in vivo*. (Junqueira et al., 2012; Li DD et al., 2013). A extrema flexibilidade do modelo de *G. mellonella* permite tanto estudos de patogenicidade microbiana, como avaliar a eficácia terapêutica de agentes antimicrobianos, permitindo o estudo simultâneo deste último com a toxicidade e a interação com a resposta imune inata (Borghi et al., 2014).

G. mellonella não possuem sistema imune adquirido, mas, possuem uma resposta inata bem desenvolvida, que envolve componentes humorais e celulares incluindo a produção de peptídeos antimicrobianos e lipídeos (Harding et al., 2013; Borghi et al., 2014). Células epiteliais do intestino médio da larva compartilham de fenótipos fisiológicos similares às células intestinais de mamíferos (Nathan, 2014). Os hemócitos, células mais numerosas na hemolinfa de *G. mellonella*, são os principais componentes da defesa celular. Estas células atuam como fagócitos especializados (plasmócitos e células granulares) e realizam funções similares aos macrófagos e neutrófilos humanos (Harding et al., 2013). Outra forma de defesa é a capacidade de nodulação que consiste no encapsulamento dos micro-organismos

limitando sua limitando sua replicação (Dunphy et al., 2003; Harding et al., 2013).

Além das infecções por *C. albicans* (Cotter et al., 2000; Fuchs et al., 2010; Junqueira et al., 2011; Chibebe et al., 2013), *G. mellonella* tem sido utilizada recentemente para estudar a patogênese da infecção por outros patógenos, incluindo: *Acinetobacter baumannii* (Peleg et al., 2009; Gaddy et al., 2012); *Aspergillus fumigatus* (Fallon et al., 2011), *Bacillus cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2011); *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis, Aballay, 2005), *Enterococcus faecalis* (Yasmin et al., 2010; Michaux et al., 2011); *Enterococcus faecium* (Chibebe Junior et al., 2013); *Escherichia coli* (Leuko, Raivio, 2012); *Francisella tularensis* (Aperis et al., 2007) *Pseudomonas aeruginosa* (Jander et al., 2000; Miyata et al., 2003), *Staphylococcus aureus* (Desbois, Coote, 2011); *Streptococcus pyogenes* (Olsen et al., 2011) e *Yersinia pseudotuberculosis* (Champion et al., 2009). Entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que estudaram a ação de *S. mitis* e *S. sanguinis*, bem como sua interação simultânea com *C. albicans* no modelo de invertebrado de *G. mellonella*.

Assim, diante do potencial patogênico apresentado por estes micro-organismos, torna-se de interesse científico analisar as interações dos mesmos em comunidades mistas, e os efeitos causados pelos estreptococos no potencial patogênico de *C. albicans in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar interações entre *C. albicans* com *S. sanguinis* e com *S. mitis* em biofilmes e verificar a patogenicidade destes micro-organismos em modelo experimental invertebrado.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a contagem de UFC/mL de *C. albicans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, em biofilmes isolados e associados.

Avaliar a atividade metabólica de *C. albicans* nas associações com *S. sanguinis* e *S. mitis* utilizando-se método XTT.

Avaliar a patogenicidade de *C. albicans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, isolados e associados, em modelo experimental *in vivo* de *G. mellonella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e padronização das cepas

As cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) utilizadas foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e encontravam-se congeladas a -70 °C no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia, do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos, UNESP.

Após reativação das cepas, foram preparadas suspensões padronizadas utilizando *C. albicans* (ATCC 18804), *S. sanguinis* (ATCC 7073) e *S. mitis* (ATCC 4945). As cepas de *C. albicans* foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e as cepas de *S. sanguinis* e *S. mitis* em ágar infusão cérebro coração - BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, Detroit, USA).

Os micro-organismos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h. Todos os ensaios com cepas de *S. sanguinis* e *S. mitis* foram incubados em estufa bacteriológica sob condições de microaerofilia (5% de CO₂).

Após o tempo de incubação, foram realizados esfregaço em lâminas e posteriormente coradas pela coloração de Gram das colônias obtidas para confirmar a pureza das culturas. A seguir, as células microbianas foram centrifugadas (2000 Xg/10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 10 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato – PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Esse procedimento foi repetido novamente. A padronização do número de células da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal,

São Paulo, Brasil) obtendo-se concentração de 10^7 micro-organismos/mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de ondas utilizado foram respectivamente: 0,381 e 530 nm para *C. albicans* e 0,560 e 398 nm para *S. sanguinis* e *S. mitis*.

4.1.1 Formação dos biofilmes isolados e associados de *C. albicans*

Para a formação dos biofilmes, foi utilizada a metodologia descrita por Thein et al. (2006) com modificações.

Os biofilmes foram formados no fundo de placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA), com $n = 10$ para cada grupo experimental. Para isso, inicialmente foram inoculados 100 μ L da suspensão padronizada de células de *C. albicans* (10^7 céls/mL). As placas foram incubada em agitação com rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37 °C por 90 min para promover a adesão inicial de *C. albicans*.

Após a fase inicial de adesão, a suspensão foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remover as células não aderidas. Um total de 100 μ L de soro fetal bovino (Gibco – New York, EUA) foi transferido para cada poço e a placa reincubada por 2 h. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com PBS. Para os biofilmes associados, em cada poço da placa de 96 poços, foram inoculados 50 μ L da suspensão padronizada de *S. mitis* ou *S. sanguinis*.

Para a promoção do crescimento do biofilme, 70 μ L de *Yeast Nitrogen Base* – YNB (Difco, Detroit, USA) e 30 μ L de caldo Infusão Cérebro-Coração – BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, Difco, Detroit, USA) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com agitação de 75 rpm. sob condições de microaerofilia (5% de CO₂), por 48 h. O caldo foi trocado após 24 h.

4.1.2 Formação dos biofilmes de *S. mitis* e *S. sanguinis* isolados

As suspensões para os biofilmes de estreptococos foram realizadas simultaneamente, utilizando-se os mesmos passos para equiparar com os biofilmes isolados e em associação de *C. albicans*, propostos no item 4.1.1. Foram inoculados 50 µL da suspensão padronizada de *S. mitis* ou *S. sanguinis*, em cada poço da placa de 96 poços com $n = 10$ para cada micro-organismo, e para a promoção do crescimento dos biofilmes, foi adicionado 100 µL de caldo BHI. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com agitação de 75 rpm sob condições de microaerofilia (5% de CO₂), por 48 h. O caldo foi trocado após cada 24 h.

4.1.3 Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

Após 48 h, cada poço contendo biofilme foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, o biofilme de cada poço aderido ao fundo da placa foram dispersos em homogeneizador ultra-sônico (Sonics Vibra Cell, Connecticut, USA) com potência de 50 W, por 30 s, utilizando ponteira multicanal. A partir da solução obtida foram realizadas diluições decimais das suspensões dos biofilmes, as quais foram semeadas em placas contendo meios de cultura seletivos específicos para cada micro-organismo; ágar Sabouraud dextrose com 50 mg/L de cloranfenicol (União Química, São Paulo, Brasil) para *C. albicans*, e ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, USA) para *S. sanguinis* e *S. mitis*. Nos biofilmes isolados de *S. mitis* e *S. sanguinis* foi usado ágar BHI. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

e o número obtido foi transformado em logaritmo de base 10 ($\log_{10}$) para cálculo estatístico.

4.2 Atividade metabólica

O ensaio colorimétrico com XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofnil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, sal sódico, Aldrich Chemical, Wisconsin, EUA] foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Jin et al. (2003). Os biofilmes foram formados, conforme descrito anteriormente (item 4.1.1) apresentando $n = 10$ para cada grupo experimental, lavados duas vezes com 250 μL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS - *Phosphate Buffered Saline*). Em seguida 197,5 μL de PBS, 50 μL de XTT e 2,5 μL de menadiona (Aldrich Chemical, Wisconsin, EUA) foram adicionados a cada poço pré-lavado. Nos poços com os biofilmes que foram utilizados para controle negativo da atividade metabólica, após a lavagem, receberam 250 μL de PBS. Os biofilmes foram incubados no escuro a 37 °C/3 h. Em seguida, 100 μL do sobrenadante da solução foram transferidas para um novo poço e a mudança colorimétrica medida usando leitor de microplaca (Sdorf, São Paulo, Brasil) a 492 nm. O resultado da leitura foi expresso em valor de absorbância (Abs) final, obtida através da seguinte equação:

$$\text{Abs}_{\text{final}} = \text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}$$

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para ilustrar os biofilmes estudados, foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura. Os micro-organismos foram cultivados e as suspensões microbianas padronizadas conforme item 4.1, entretanto os biofilmes foram desenvolvidos em discos estéreis de poliestireno, mesmo material das placas de 96 poços ($n = 2$), de aproximadamente 8 x 2 mm de diâmetro, em placas de 24 poços (Costar Corning, New York, USA). Para os biofilmes isolados e associados de *C. albicans*, os volumes da suspensão e do soro fetal bovino foram de 1 mL. Para promoção do crescimento foram utilizados 700 μ L YNB e 300 μ L de caldo BHI. Após o desenvolvimento, os biofilmes foram lavados, duas vezes, com 2 mL de PBS para remover as células não aderidas. Nos biofilmes isolados de *S. mitis* e *S. sanguinis*, foram utilizados 500 μ L da suspensão e 1000 μ L de caldo BHI. Após o desenvolvimento, os biofilmes foram lavados, duas vezes, com 2 mL de PBS para remover as células não aderidas, e submetidos ao preparo para MEV, conforme protocolo de Pereira et al. (2013).

Os biofilmes foram fixados por imersão em 1 mL de glutaraldeído a 2,5% por 1 h, seguido de desidratação em 1 mL de soluções de álcool com concentrações crescentes (10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 min e 100% por 1 h). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C/24 h para secagem completa dos discos. Posteriormente, os discos foram transferidos para *stubs* de alumínio e foram recobertos com ouro por 120 s a 40 miliamperes (EMITECH SC62720 Sputter Coaters, Quorum Technologies Ltd - East Sussex, UK). Após a metalização, os biofilmes foram examinados e fotografados em MEV (Jeol JSM5600, Tóquio, Japão), com aumentos de 1000 e 5000 x.

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

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis et al. (2005b) e Fuchs et al. (2010) com modificações.

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 270 mg obtidas do criadouro do laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências e Tecnologia – ICT, UNESP/São José dos Campos. As lagartas foram mantidas sem ração no período experimento.

4.4.1 Determinação das concentrações microbianas subletais

Antes do estudo da curva de sobrevivência, foram realizados ensaios para determinar as concentrações microbianas subletais de *S. mitis* e *S. sanguinis* nas lagartas de *G. mellonella*.

Para isso, foram inoculadas nas lagartas, suspensões padronizadas de *S. mitis* e *S. sanguinis* em diferentes concentrações (10^2 a 10^7 células/mL). Estas suspensões foram preparadas de acordo com o item 4.1 e padronizadas em espectrofotômetro. Para cada concentração, foram utilizadas 16 lagartas. Inóculo de 5 µL de cada suspensão foi injetada com seringa de Hamilton (701N 10µ SYR (26s/2"/2) - *Hamilton Company*, Nevada, EUA) na hemolinfa de cada larva através da última *proleg* esquerda. Na *proleg* direita de cada larva foram injetadas 5 µL de PBS. No grupo controle, foram injetados 5 µL de PBS na *proleg* esquerda e igual volume na *proleg* direita. Após a inoculação as lagartas foram colocadas em placas de Petri e mantidas em estufa a 37 °C.

As lagartas foram observadas, 18 h após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente a cada 24 h, sendo o número de lagartas mortas anotadas. O experimento foi conduzido por 7 dias, ou até alguma lagarta do grupo controle ser considerada morta, quando não apresentaram nenhum movimento ao toque ou entrar no estágio de pupa.

Também foi avaliado um grupo inoculado apenas com PBS para comprovar que a morte não ocorreu pelo trauma da agulha, sendo acompanhado o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

Antes da inoculação, as seringas utilizadas para as injeções foram esterilizadas com ácido peracético (*Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, Alemanha*) de acordo com as instruções do fabricante. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foram realizadas a cada 5 injeções. Para esta limpeza a seringa foi lavada em uma sequência de 4 tubos que continham respectivamente:

- a) 20 mL de hipoclorito de sódio;
- b) 20 mL de álcool absoluto;
- c) 20 mL de água destilada estéril;
- d) 20 mL de PBS estéril.

Em cada tubo a agulha foi mergulhada e realizados 5 movimentos no êmbolo para cima e para baixo, na sequência descrita acima.

4.4.2 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Os grupos experimentais e número de lagartas utilizadas para cada experimento estão discriminadas no Quadro 1. Para

determinação da concentração subletal e curva de sobrevivência foram usadas 16 lagartas para cada grupo.

Após a incubação as células microbianas de *C. albicans*, *S. mitis* e *S. sanguinis* foram centrifugadas (2000 Xg/10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 10 mL de PBS. Esse procedimento foi repetido novamente. A padronização do número de células da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) obtendo-se concentração de 10^7 micro-organismos/mL. Em seguida foi realizada diluição seriada das suspensões para obtenção da concentração de 10^5 células/mL de *C. albicans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*. As lagartas foram inoculadas e colocadas em placas de Petri, incubadas a 37 °C e foram observadas em 18 h de incubação e depois a cada 24 h, ou até que alguma das lagartas do grupo controle (PBS) ser considerada morta, quando não apresentaram nenhum movimento ao toque ou entrar no estágio de pupa.

Quadro 1- Número de lagartas de *G. mellonella* usadas e seus respectivos grupos experimentais

Grupos experimentais	Concentração subletal (n)	Curva de sobrevivência (n)
Controle PBS	16	16
<i>C. albicans</i>	--	16
<i>S. mitis</i>	64	16
<i>S. sanguinis</i>	64	16
<i>C. albicans/S. mitis</i>	--	16
<i>C. albicans/S. sanguinis</i>	--	16
Total	144	96

4.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos no presente estudo foi realizada com auxílio do software Minitab 14 (Minitab Inc, Pennsylvania, USA). Os dados obtidos na contagem de UFC/mL dos biofilmes e os valores de Abs obtidos pelo método XTT foram submetidos à análise de distribuição. Como a distribuição foi considerada normal, foram utilizados os testes de t de *Student* (para duas variáveis) e *Tukey* (para três ou mais variáveis). Diferença estatisticamente significativa foi considerada quando o valor de *p* foi menor que 0.05. Para avaliação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, foi utilizado o teste de *Log-rank* (Mantel-Cox) utilizando o Programa *Graph Pad Prism*.

5 RESULTADOS

Inicialmente, foram realizados biofilmes monoespécie de *C. albicans*, *S. sanguinis* e *S. mitis*, e a seguir a formação de biofilmes associados de *C. albicans* com *S. sanguinis* e *C. albicans* com *S. mitis*. Os resultados obtidos nas contagens de UFC/mL ($\log_{10}$) foram analisados estatisticamente. Na figura 1 está representada a comparação da contagem de UFC/mL ($\log_{10}$) entre os biofilmes isolados de *C. albicans* e a associação de *C. albicans* com *S. mitis* e *C. albicans* com *S. sanguinis*. Pode-se observar nesta figura que o biofilme de *C. albicans* monoespécie apresentou maior crescimento, com diferença estatística, quando comparado com biofilme de *C. albicans* associado com *S. sanguinis* ($p = 0,003$) e *C. albicans* com *S. mitis* ($p = 0,003$). No entanto, a comparação entre os biofilmes associados de *C. albicans* com *S. mitis* e *C. albicans* com *S. sanguinis*, não apresentou diferença estatisticamente significantes. Os estreptococos influenciaram na redução dos biofilmes formados por *C. albicans*, em comparação aos biofilmes isolados desta levedura, em 60,3% quando da associação com *S. mitis*, e 66,3% na associação com *S. sanguinis*.

No presente estudo também foi avaliada a influência de *C. albicans* em biofilmes de estreptococos. Na figura 2 pode-se observar a contagem de UFC/mL ($\log_{10}$) para biofilme monoespécie de *S. mitis* e sua associação com *C. albicans*, a qual foi diferente estatisticamente ($p = 0,001$). Na figura 3, estão os resultados dos biofilmes de *S. sanguinis* isolados e associados com *C. albicans*, os quais também foram diferentes estatisticamente. Estes resultados demonstraram que a levedura *C. albicans* pode ter propiciado um aumento nos biofilmes de estreptococos.

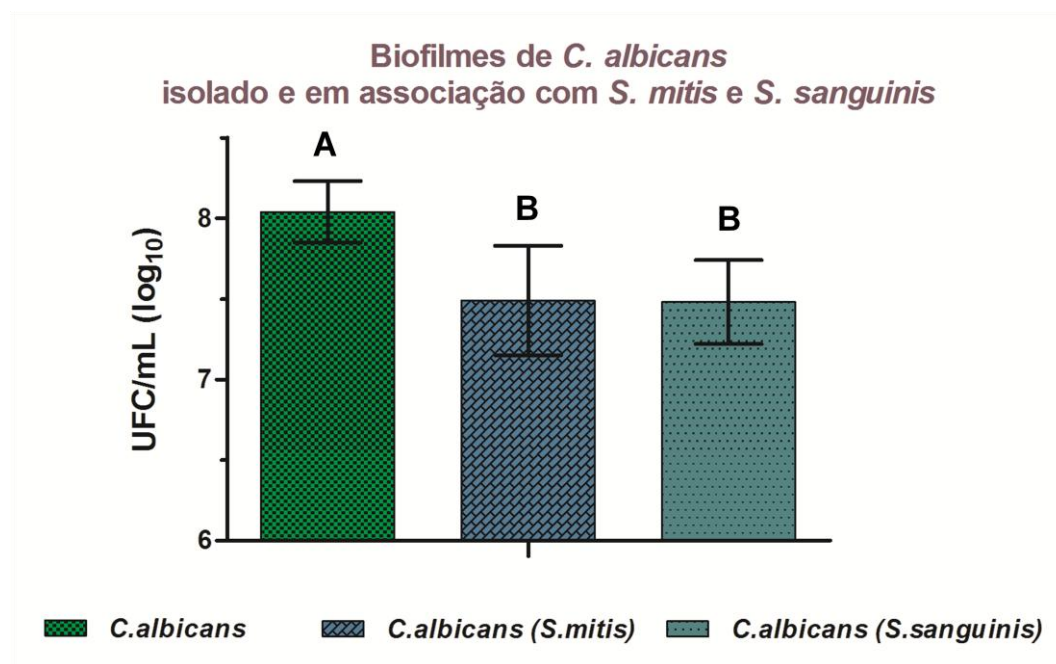


Figura 1 - Médias e desvios padrão dos dados de UFC/mL ($\log_{10}$) obtidos na formação de biofilmes isolados de *C. albicans* e em associação com *S. mitis* e *C. albicans* com *S. sanguinis*, com $n = 10$. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

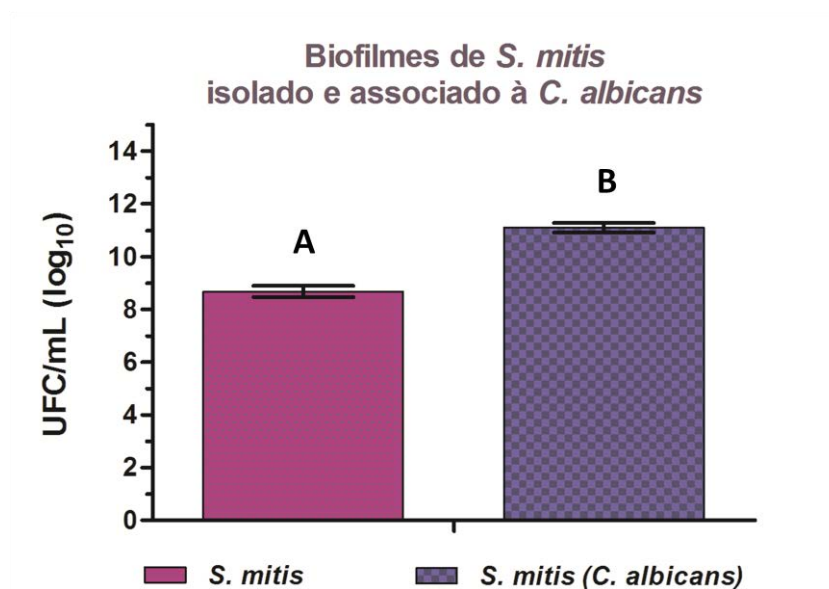


Figura 2 - Médias e desvios padrão dos dados de UFC/mL ($\log_{10}$) obtidos de biofilme de *S. mitis* isolado e associado com *C. albicans*, com $n = 10$. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (teste *t-Student*, $p < 0,05$).

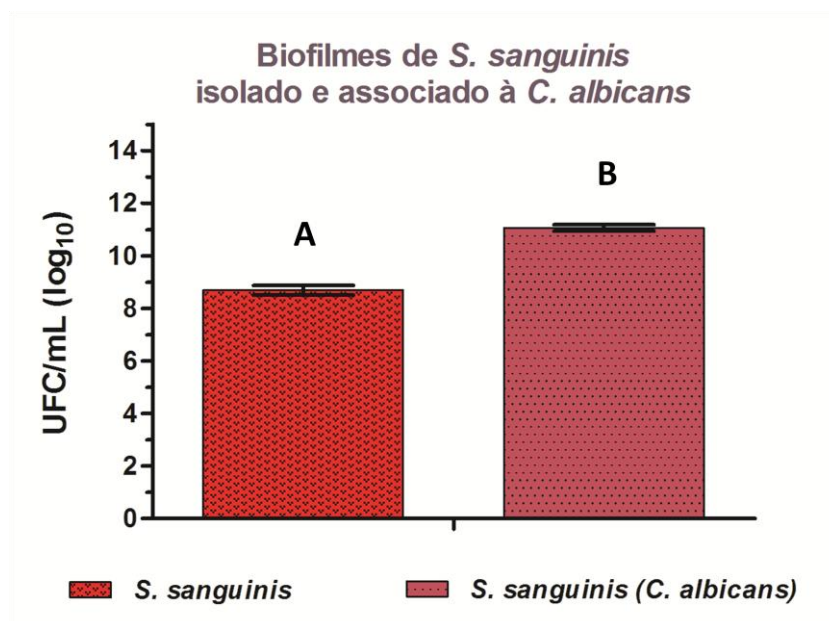


Figura 3 - Médias e desvios padrão dos dados de UFC/mL ($\log_{10}$) obtidos de biofilme de *S. sanguinis* isolado e associado à *C. albicans*, com $n = 10$. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (teste t-Student, $p < 0,05$).

Na quantificação da atividade metabólica de *C. albicans*, realizada através do teste colorimétrico com o sal XTT (Figura 4), os resultados foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$), sem diferença significativa nos biofilmes isolados e associados de *C. albicans*. Foram encontradas taxas de redução, em relação aos biofilmes monoespécie de *C. albicans*, na associação de *C. albicans* com *S. mitis* de 23,0%, e de 48,4% quando a levedura foi associada com *S. sanguinis*.

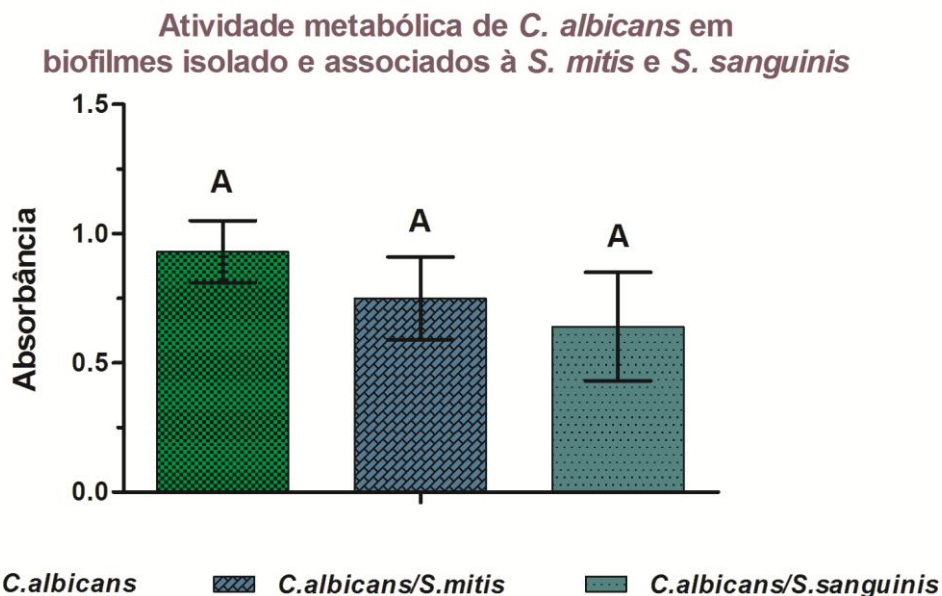


Figura 4 - Médias e desvios padrão da atividade metabólica de *C. albicans*, mensurada em absorbância, em biofilmes isolados e associados à *S. mitis* e *S. sanguinis* obtidos através do ensaio colorimétrico com sal XTT e menadiona, com $n = 10$. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A partir das imagens obtidas por MEV foi possível observar grande número de células nos biofilmes monotípicos. Para o biofilme monotípico de *C. albicans* (Figuras 5A e 5B), observou-se grande quantidade de blastoconídeos e hifas. No biofilme isolado de *S. mitis* (Figuras 5C e 5D) observou-se grande quantidade de cocos e no biofilme isolado de *S. sanguinis* (Figuras 5E e 5F) além da presença de cocos, observa-se também a presença de matriz extracelular, que representa uma característica importante dos estreptococos na formação de biofilme. Para as imagens de biofilmes multiespécies, podemos observar uma possível inibição de *C. albicans* quando associada a *S. mitis* (Figuras 6A e 6B) com uma menor quantidade de células e hifas, esta diminuição ocorre também com a associação de *C. albicans* com *S. sanguinis* (figura 6C e 6D) com a diferença de esta associação apresentar uma grande quantidade matriz extracelular.

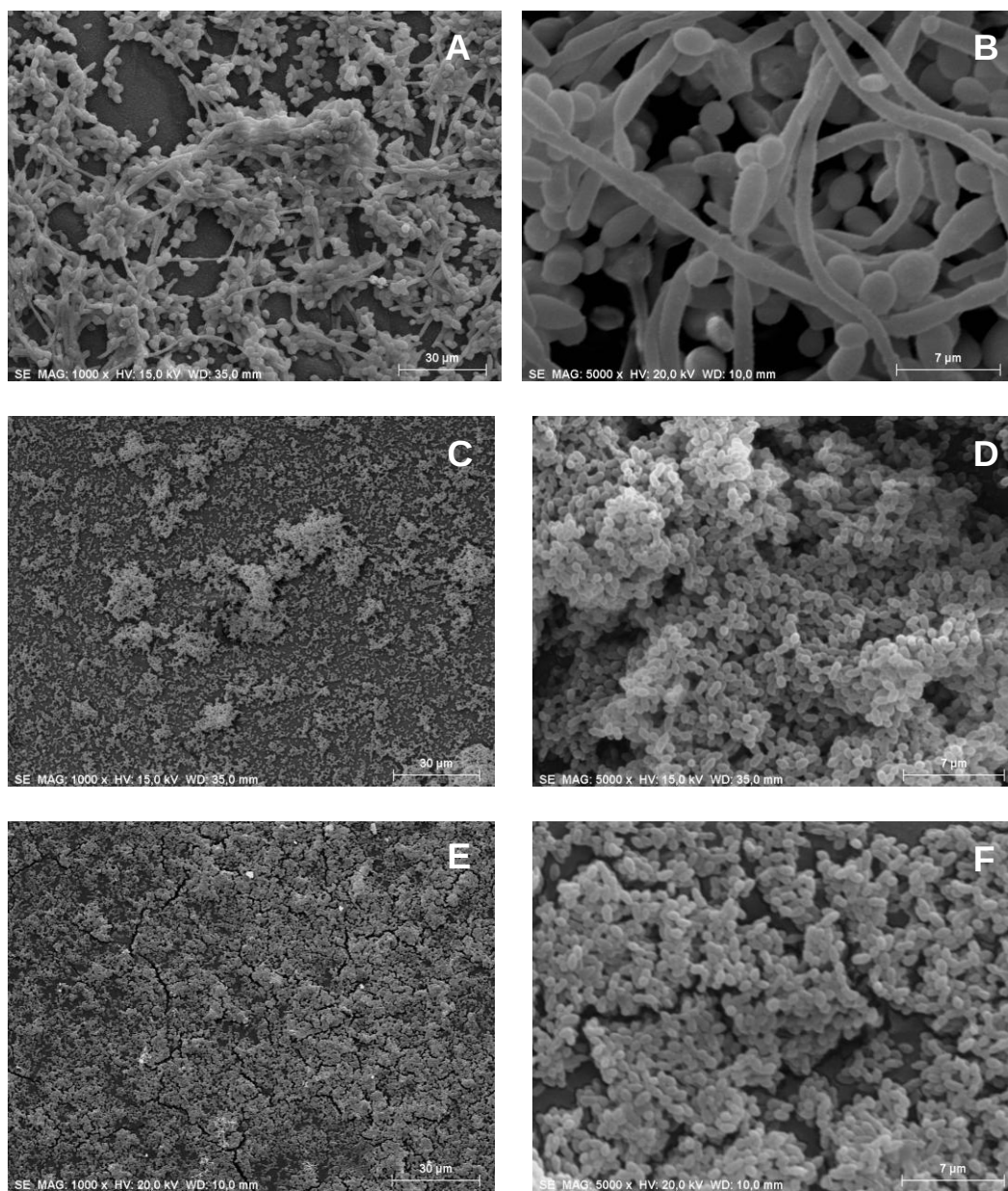


Figura 5 - MEV de biofilmes isolados formados em corpos-de-prova de poliestireno após 48 h de crescimento. A) e B) MEV do corpo-de-prova com biofilme isolado de *C. albicans*. Observam-se leveduras e hifas (aumento de 1000x e 5000x respectivamente); C) e D) MEV de corpos-de-prova com biofilmes de *S. mitis*, observa-se um aglomerado de cocos, em aumento de 1000x e 5000x respectivamente; E) e F) MEV de corpos-de-prova com biofilme de *S. sanguinis*, observa-se grande quantidade de cocos em aumento de 1000x e 5000x.

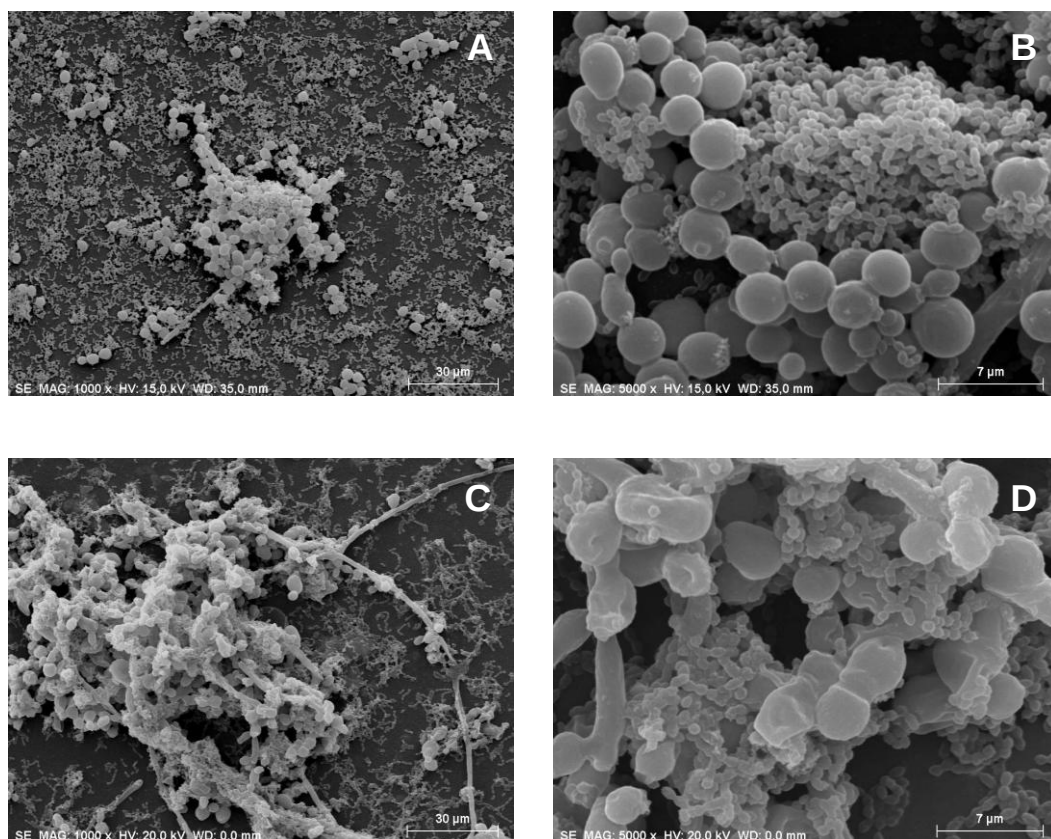


Figura 6 – MEV de biofilmes associados formados em corpos-de-prova de poliestireno após 48 h de crescimento. A) e B) MEV de corpo-de-prova com biofilme de *C. albicans* associado à *S. mitis*, observa-se leveduras e cocos e poucas hifas, em aumento de 1000x e 5000x, respectivamente; C) e D) MEV de corpos-de-prova com biofilmes de *C. albicans* associado a *S. sanguinis*, observa-se cocos, leveduras, hifas e a presença de polímeros extracelulares, em aumento de 1000x e 5000x respectivamente.

A patogenicidade dos micro-organismos verificados em *G. mellonella* foi avaliada por meio da curva de sobrevivência que está ilustrado na figura 7. Inicialmente foram realizados testes iniciais para determinar a dose subletal da concentração de células para cada micro-organismo para inoculação em *G. mellonella*. Na figura 7, observou-se que o grupo controle, em que só foi inoculado PBS, não houve morte das lagartas. O grupo de *C. albicans* monoespécie conforme gráfico A e B apresentou maior percentual de morte das lagartas (43,75%). Enquanto os percentuais de sobrevivência das lagartas de *G. mellonella* foram de 12,5% para os grupos isolados *S. mitis* (Figura 7A) e sua associação com

C. albicans (Figura 7B), e de 18,75% para os grupos isolados de *S. sanguinis* (Figura 7A) e sua associação com *C. albicans* (Figura 7B), demonstrando um baixo percentual de patogenicidade. Na análise entre *C. albicans* com os grupos *C. albicans* associada com *S. mitis* e *C. albicans* associada com *S. sanguinis* e na análise de *C. albicans* com biofilmes isolados de *S. mitis* e *S. sanguinis* não foram obtidos resultados estatisticamente significantes.

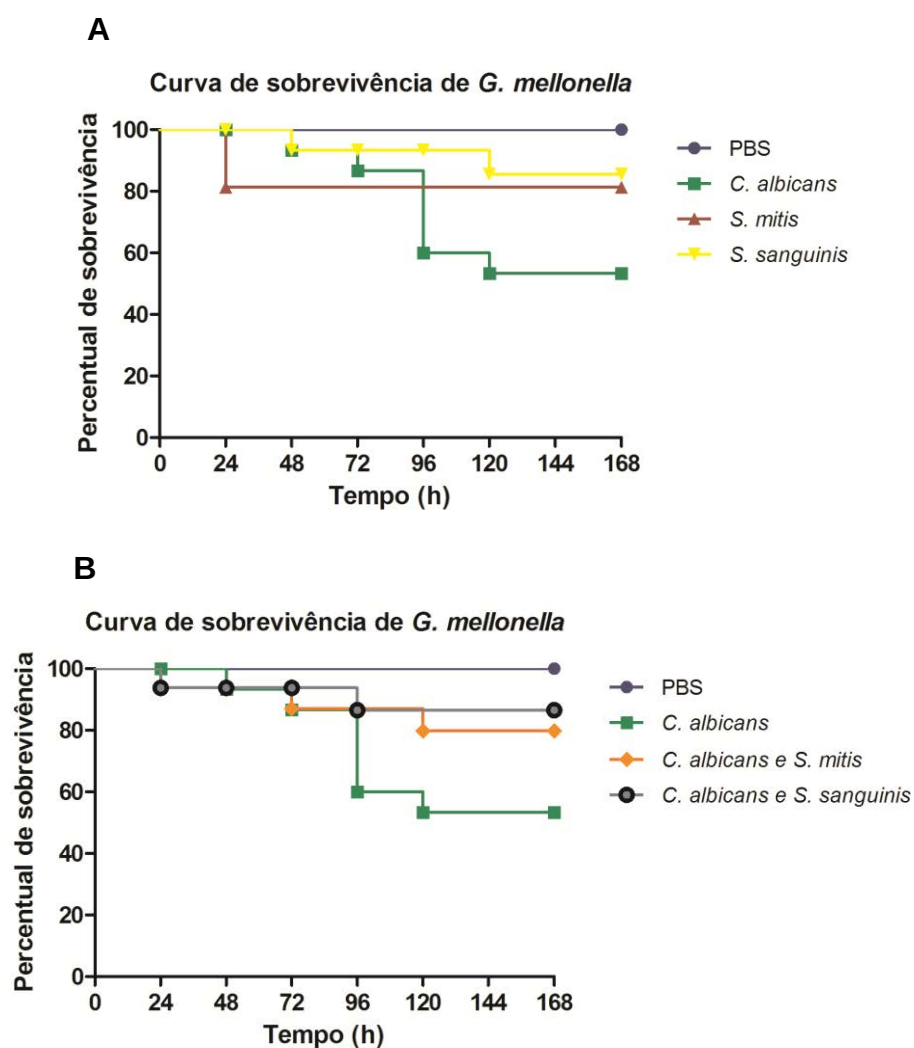


Figura 7 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* (n = 16), após inoculação de *C. albicans*, *S. mitis* e *S. sanguinis* isolados e em associação. **A** grupos experimentais, PBS, *C. albicans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e **B** grupos experimentais PBS, *C. albicans*, *C. albicans* associado com *S. mitis*, e associado com *C. albicans* e *S. sanguinis*.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do biofilme ocorre pelo crescimento de micro-organismos em camadas, de forma complexa e dinâmica, permitindo a colonização por diferentes espécies. Isso ocorre pela comunicação entre os micro-organismos através do *quorum sensing* o que proporciona uma manutenção nutricional e das espécies presentes no biofilme, bem como as protege da defesa ao sistema imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos (Wright et al., 2013; Struzycka, 2014). O biofilme apresenta outras vantagens, como a proteção ao ambiente, à resistência de remoção física e química das células, a cooperação metabólica e regulação da expressão de genes (Ramage et al., 2009, 2012).

Outro aspecto característico do biofilme é a presença da matriz extracelular, que apresenta várias funções como coesão celular, manutenção da estrutura da comunidade microbiana, recurso nutricional e proteção de xenobióticos, antimicrobianos e proteção do sistema imune do hospedeiro (Zarnowski et al., 2014).

As interações entre as diversas espécies presentes em biofilmes mistos podem ser sinérgicas, em que a presença de um micro-organismo gera um nicho para outros, que por sua vez podem que auxiliam na retenção de outros micro-organismos. Entretanto, pode ocorrer antagonismo entre as espécies, em que produtos como o lipopolissacarídeo da parede celular de Gram negativas; liberados por um micro-organismo impedem o crescimento e instalação de outros micro-organismos no biofilme (Jorge, 2012).

O presente estudo avaliou a contagem de UFC/mL ($\log_{10}$) dos biofilmes isolados e associados de *C. albicans*, *S. mitis* e *S.*

sanguinis. Os colonizadores iniciais do biofilme bucal, *S. mitis* e *S. sanguinis*, apresentam a capacidade de inibir micro-organismos cariogênicos e periodontopatogênicos, mas, apesar de sua capacidade reguladora do biofilme, são capazes de induzir doença quando atingem a corrente sanguínea, como a endocardite bacteriana que muitas vezes pode ser fatal para o indivíduo. *C. albicans* está associada com estomatite por prótese e candidose bucal, e parecem estar presentes em biofilmes cariogênicos e periodontopatogênicos. *S. sanguinis* possui estruturas semelhantes ao pili que estreptococos patogênicos, que apresentam função de ligação bacteriana à fibronectina. A função deste pili é propiciar a interação com a amilase salivar, o que contribui para a colonização de *S. sanguinis* na cavidade oral humana (Okahashi et al., 2011). Por outro lado, *C. albicans* colonizam a superfície bucal, proliferam e provocam danos através da expressão de seus fatores de virulência, como aderência as células do hospedeiro, hidrofobicidade celular, produção de hifas, formação de biofilme, e secreção de enzimas extracelulares (Schaller et al., 2005; Mishra et al., 2007).

Através da contagem de UFC/mL dos biofilmes analisados no presente estudo, e traçando um comparativo com os biofilmes isolados de *C. albicans* e associados, observou-se que houve um menor crescimento da levedura quando da associação com *S. mitis* ($60,3 \pm 28,8\%$) e com *S. sanguinis* ($66,3 \pm 23,1\%$), e um aumento nas células de *S. mitis* e de *S. sanguinis* quando associados com *C. albicans*, comparados com o biofilme monoespécie dos respectivos estreptococos.

Outros estudos em biofilmes de interação de *C. albicans* e estreptococos também apresentaram diminuição nas contagens da levedura. No estudo de Romeiro (2009), foi analisada a aderência de *S. sanguinis*, *C. albicans* e associações destes micro-organismos com *S. mutans* às superfícies de implantes dentários com diferentes tratamentos de superfície, e se verificou que *S. sanguinis* isolado apresentou uma menor aderência quando comparada a sua associação com *S. mutans*.

e/ou *C. albicans*, dados que corroboram os presentes resultados. Pereira et al. (2011) avaliaram os efeitos específicos da terapia fotodinâmica em diferentes biofilmes mono e multiespécies. Através dos resultados desses autores pode-se observar que, nos biofilmes controles (sem nenhum tratamento) houve diminuição do crescimento em UFC/mL de *C. albicans* associada com *S. mutans*, demonstrando novamente que a interação entre estas espécies é desfavorável para a levedura.

S. sanguinis possui proteínas intracelulares e exócrinas que de acordo com o estudo de Ma et al. (2014), causaram efeitos antagonista para *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida tropicalis* e *C. albicans*, inibindo os biofilmes formados pelos mesmos. Além disso, segundo os autores, estas proteínas afetaram o crescimento e a morfologia de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Os autores, entretanto, não conseguiram identificar o mecanismo inibitório dessas proteínas. Outra característica importante no controle de outros micro-organismos por *S. sanguinis* é a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que propiciou um resultado antagonista ao crescimento de *S. mutans* (Zheng et al., 2011). Okahashi et al. (2014) concluíram que H_2O_2 derivado do grupo *mitis* de estreptococos é uma citotoxina potencial que atua na indução de interleucina-6 (IL-6), o que contribui para patogenicidade deste grupo.

Nas ilustrações de MEV obtidas no presente estudo, se observou menor quantidade de células leveduriformes (blastocónídeos) e hifas nos biofilmes multiespécie de *C. albicans*. Outro dado interessante foi à presença de matriz extracelular no biofilme monotípico de *S. sanguinis* e na associação de *C. albicans*, o que não ocorreu com os biofilmes monoespécie de *S. mitis* e de sua associação com a levedura. *S. mitis* possui capacidade variável de formar pequena quantidade de polissacarídeo extracelular Uzeda (2002), o que reforça os nossos achados neste estudo. Já a presença de matriz extracelular nos biofilmes associados de *S. sanguinis* e *C. albicans* estão semelhantes aos de

Pereira et al. (2011), no qual também foi observada, através de MEV, a presença de biofilme espesso, com presença de matriz extracelular na interação de *C. albicans* com *S. mutans*.

A atividade metabólica XTT, é uma técnica utilizada para estimar o crescimento viável do biofilme e analisar o impacto de terapias antimicrobianas nos mesmos, além de ser considerado um método reprodutível, exato, de baixo custo e eficiente para mensurar os biofilmes (Costa et al., 2013). Este ensaio indica a atividade metabólica das células de leveduras, medida através da absorbância, através da mudança de coloração, obtida pela redução do sal XTT, resultando em uma reação de coloração alaranjada, mensurada em espectrofotômetro. Na quantificação da atividade metabólica de *C. albicans*, não foram observados resultados estatisticamente significantes, não havendo diferença na atividade mitocondrial de *C. albicans* isolada ou quando comparada os biofilmes associados. No entanto, o percentual de redução do biofilme associado de *C. albicans* em comparação com o seu biofilme isolado foi de $23,0 \pm 15,2\%$ em associação com *S. mitis*, $48,4 \pm 25,7\%$ com *S. sanguinis*. Estes resultados mostraram-se semelhantes comparados à contagem de UFC/mL ($\log_{10}$).

Estudos de Piva et al. (2011) avaliaram os efeitos de *Escherichia coli* sobre os biofilmes de *C. albicans* formados *in vitro*. Os autores verificaram maior viabilidade celular em biofilme monotípico de *C. albicans* quando comparado com biofilme heterotípico com *E. coli*, sugerindo que bactéria promoveu certa inibição da levedura. Park SJ et al. (2014) também mostraram a influência da presença de bactérias na formação de biofilme de *C. albicans* pelo método XTT, e observaram que no biofilme isolado a cepa 53 de *C. albicans* (isolada da cavidade bucal de indivíduos saudáveis) a atividade metabólica foi maior (0.392 ± 0.064) comparado com sua associação com *Streptococcus pyogenes* (0.298 ± 0.026) e com *Streptococcus salivarius* (0.198 ± 0.053). A redução em biofilme associado também foi observada na análise de biofilme isolado

da cepa 163 de *C. albicans* (isolada do sangue) em que os valores foram de 2.406 ± 0.064 , e apresentou uma grande redução quando associado com *S. pyogenes* (0.349 ± 0.024) e com *S. salivarius* (0.157 ± 0.032).

O modelo invertebrado *G. mellonella*, tem sido utilizado para estudar mecanismos de patogenicidade de várias espécies de bactérias e fungos essenciais e patogênicos para os seres humanos, e tem produzido resultados que correlacionam estreitamente com os obtidos a partir de estudos similares aos utilizados com modelos experimentais de mamíferos (Nathan, 2014; Harding et al., 2013). Além disso, *G. mellonella* permite o estudo simultâneo da eficácia terapêutica, da toxicidade e da interação com a resposta imune inata (Cirasola et al., 2013). Inicialmente no presente estudo, foram realizados ensaios para obter as concentrações sub letais dos micro-organismos definindo-as em 10^5 céls/mL.

C. albicans apresentou maior patogenicidade, com a morte de maior número de *G. mellonella*. Os grupos de estreptococos monoespécie e suas associações com *C. albicans* apresentaram número menor de lagartas mortas. Os grupos isolados apresentaram um percentual de morte de *G. mellonella* de 43,75% para *C. albicans*; 12,5% para *S. mitis*; e 18,75% para *S. sanguinis*. Nas associações os percentuais de morte foram de: 12,5% para *C. albicans* e *S. mitis*; e 18,75% para *C. albicans* e *S. sanguinis*. Com esses resultados podemos supor que *C. albicans* foi mais virulento do que os estreptococos no estudo *in vivo*, e que *S. mitis* e *S. sanguinis* diminuíram a virulência de *C. albicans*. Outro dado importante foi que não houve morte das lagartas após 120 h, sugerindo que o sistema imune de *G. mellonella* foi capaz de atuar na defesa contra os micro-organismos. Barbosa (2014) avaliou a interação entre *S. mutans* e *C. albicans* em modelo *in vivo*, e constatou que a interação promoveu a redução da formação de hifas, constatou também aumento na sobrevivência de *G. mellonella*. No estudo de Vilela (2013) em que foram avaliadas as interações entre *Lactobacillus*

acidophilus e *C. albicans* em *G. mellonella*, observou-se aumento significativo na sobrevivência das lagartas na interação entre bactérias e leveduras, sugerindo a ação probiótica de *L. acidophilus*. Chibebé et al. (2013) avaliaram a ação da terapia fotodinâmica na infecção de *C. albicans* em modelo *in vivo* de *G. mellonella*, e constataram que este tratamento prolongou a sobrevivência das lagartas infectadas por *C. albicans*, além de reduzir a carga fúngica na hemolinfa. Neste mesmo trabalho, os autores também constataram que a terapia fotodinâmica associada com fluconazol aumentou a suscetibilidade de *C. albicans* resistentes ao antifúngico.

Borghi et al. (2014) simularam infecções invasivas em modelo experimental *G. mellonella*, comparando o potencial de virulência de cepas de *C. albicans* invasoras produtoras e não produtoras biofilmes, e constataram através de microscopia eletrônica e óptica que biofilme de cepas produtoras de biofilme matou mais rapidamente as lagartas que cepas não produtoras, e também foram capazes de invadir tecidos produzindo filamentos.

S. mitis, *S. sanguinis* e *C. albicans* estão entre os colonizadores comensais mais presentes e abundantes da cavidade oral, e podem se tornar patogênicos por mudanças ambientais do hospedeiro. Não foram encontrados na literatura estudos sobre a interação de *C. albicans* com *S. mitis*, bem como a mensuração da atividade metabólica desta levedura com os estreptococos estudados. Além disto, também não há, até o momento, pesquisas de interação de *C. albicans*, *S. sanguinis*, e *S. mitis* no modelo *in vivo* de *G. mellonella*, o que torna este estudo inédito dentro dos parâmetros aqui analisados. Como perspectiva futura, novos estudos no âmbito molecular, são necessários, para avaliar se as espécies de bactérias aqui estudadas são capazes de interferir nos genes relacionados à formação de biofilmes de *C. albicans*.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- a) *S. mitis* e *S. sanguinis* apresentaram uma resposta antagônica, quando do crescimento em biofilme heterotípico com *C. albicans*;
- b) *S. mitis* e *S. sanguinis* foram favorecidos na associação com *C. albicans*, apresentando maior crescimento em biofilmes mistos;
- c) *C. albicans* apresentou maior patogenicidade que *S. mitis* e *S. sanguinis* em modelo experimental de invertebrado *G. mellonella*;
- d) *S. mitis* e *S. sanguinis* demonstraram diminuição da patogenicidade de *C. albicans* em *G. mellonella*.

8 REFERÊNCIAS*

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-17.

Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect.* 2007;9(6): 729-34.

Barbosa JO. Avaliação dos efeitos de *Streptococcus mutans* sobre formação de biofilme e morfogênese de *Candida albicans* in vitro e estudo experimental em *Galleria mellonella* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

Borghi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D, et al. Correlation between *Candida albicans* biofilms formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. *Future Microbiol.* 2014 Feb;9(2):163-73.

Champion OL, Cooper IA, James SL, Ford D, Karlyshev A, Wren BW, et al. *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology* 2009; 155(Pt 5):1516-22.

Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol.* 2013 Oct 1;13:217.

Cirasola D, Sciota R, Vizzini L, Ricucci V, Morace G, Borghi E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future Microbiol.* 2013 Jun;8(6):799-805.

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

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;27(2):163-9.

Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(8):1785-90.

Douglas CWI, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of *viridans* streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol*. 1993;39(3):179-82.

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

Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012;22:2–16.

Dunphy GB, Oberholzer U, Whiteway M, Zakarian RJ, Boomer I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). *Can J Microbiol*. 2003 Aug;49(8):514-24.

Duran-Pinedo AE, Baker VD, Frias-Lopez J. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces expression of transposases and cell death of *Streptococcus mitis* in a biofilms model. *Infect Immun*. 2014 Aug;82(8):3374-82.

Evans K, Stone V, Chen L, Ge X, Xu P. Systematic study of genes influencing cellular chain length in *Streptococcus sanguinis*. *Microbiology*. 2014;160(Pt 2):307-15.

Facklam R. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):613-30.

Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*. 2011;2(5):413-21.

Fox EP, Nobile CJ. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*. 2012;3(6):315-22.

Fonzi WA, Irwin MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. Infect Immun. 1997;65(9):3539-46.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microbes Infect. 2010 Jun;12(6):488-96.

Fujishima K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Tokuda M, Torii M, Komatsuzawa H. *dpr* and *sod* in *Streptococcus mutans* are involved in coexistence with *S. sanguinis*, and *PerR* is associated with resistance to H₂O₂. Appl Environ Microbiol. 2013;79(5):1436-43.

Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infect Immun. 2012;80(3):1015-24.

Ge XC, Kitten T, Chen ZM, Lee SP, Munro CL, Xu P. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. Infect Immun. 2008;76(6):2551-9.

Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG, Ting-Li. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and *quorum sensing*. Fungal Genet Biol. 2011;48(8):747-63.

Harding CR, Schroeder GN, Collins JW, Frankel G. Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. J Vis Exp. 2013 Nov 22;(81):e50964.

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

Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y, et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the *in vitro* growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. Appl Environ Microbiol. 2012;78(7):2190-9.

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

Jacobsen ID. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. Virulence. 2014 Feb 15;5(2):237-9.

Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis.* 2010;16(8):729-39.

Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH. Community interactions of oral streptococci. *Adv Appl Microbiol.* 2014;87:43-110.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 2000;182(13):3843-5.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell.* 2009;8(11):1658-64.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. *Oral Dis.* 2004;10(2):106-12.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005;13(12):589-95.

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):2961-7.

Jorge AOC. *Microbiologia e imunologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 348 p.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV- positive individuals have similar *in vitro* biofilm- forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol.* 2011;11:247.

Junqueira JC, Jorge AO, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, Costa AC, et al. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers Med Sci.* 2012;27(6):1205-12.

Kang MS, Oh JS, Lee HC, Lim HS, Lee SW, Yang KH, et al. Inhibitory Effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol.* 2011;49(2):193-9.

Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413-37.

Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006;42:47-79.

Kreth J, Merritt J, Qi F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):397-403.

Krueger KE, Ghosh AK, Krom BP, Cihlar RL. Deletion of the *NOT4* gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiology.* 2004;150(Pt 1):229-40.

Kumamoto CA, Vines MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 2005;7(11):1546-54.

Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, Cook GS, Costerton JW, Demuth DR. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology.* 2002;148(Pt 6):1627-36.

Levitz RE. Prosthetic-valve endocarditis caused by penicillin-resistant *Streptococcus mitis*. *N Engl J Med.* 1999;340(23):1843-4.

Leuko S, Raivio TL. Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella*. *Infect Immun.* 2012;80(9):3077-85.

Li DD, Deng L, Hu GH, Zhao LX, Hu DD, Jiang YY, et al. Using *Galleria mellonella* - *Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(9):1482-7.

Li YH, Tian XL. *Quorum Sensing* and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors.* 2012;12(3):2519-38.

Ma S, Li H, Yan C, Wang D, Li H, Xia X, et al. Antagonistic effect of protein extracts from *Streptococcus sanguinis* on pathogenic bacteria and fungi of the oral cavity. *Exp Ther Med.* 2014 Jun;7(6):1486-94.

Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-9.

Mancl KA, Kirsner RS, Ajdic D. Wound biofilms: Lessons learned from oral biofilms. *Wound Repair Regen.* 2013;21(3):352-62.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. J Dent. 2010;38 Suppl 1:S11-5.

Marsh P, Martin MV. Microbiologia Oral.4 ed. São Paulo: Santos, 2004; 192 p.

Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 2011;79(7):2638-45

Mishra MM, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. Acta Microbiol Immunol Hung. 2007;54(3):201-35.

Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Infect Immun. 2003;71(15):2404-13.

Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. Infect Immun. 2005a;73(7):3833-41.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infect Immun. 2005b Jul;73(7):3842-50.

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

Nathan S. New to *Galleria mellonella*: modeling an ExPEC infection. Virulence. 2014 Apr 1;5(3):371-4.

Nikawa H, Egusa H, Makihiro S, Nishimura M, Ishida K, Furukawa M, et al. A novel technique to evaluate the adhesion of *Candida* species to gingival epithelial cells. Mycoses. 2003;46(9-10):384-9.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009;73(3):407-50.

Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, et al. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. Microb Pathog. 2011;50(3-4):148-54.

Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, Kawabata S. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral *mitis* group of streptococci. PLoS One. 2014 31;9(1):e88136.

Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). Virulence 2011;2(2):111-9.

Park HK, Myung SC, Kim W. Comparative transcriptomic analysis of *Streptococcus pseudopneumoniae* with *viridans* group streptococci. BMC Microbiol. 2012;12:77.

Park SJ, Han KH, Park JY, Choi SJ, Lee KH. Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. Yonsei Med J. 2014 Mar;55(2):449-58.

Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(6):2605-9.

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

Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms *in vitro*. Lasers Med Sci. 2013 May;28(3):859-64.

Piva E, Barbosa JOB, Rossoni RD, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados *in vitro*: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. Rev Odontol UNESP. 2011;40(5):222-7.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005;4(4):633-8.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our Current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009;35(4):340-55.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. Int J Microbiol. 2012;2012:528521.

Redanz S, Standar K, Podbielski A, Kreikemeyer B. A five-species transcriptome array for oral mixed-biofilm studies. PLoS One. 2011;6(12):e27827.

Renvert S, Pettersson T, Ohlsson O, Persson GR. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. J Periodontol. 2006;77(7):1110-9.

Ricker A, Vickerman M, Dongari-Bagtzoglou A. *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*. J Oral Microbiol. 2014 Jan 29;6.

Romeiro RL. Aderência *in vitro* de *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* em implantes dentários de superfície lisa ou tratada [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Univ Estadual Paulista; 2009.

Rukke HV, Hegna IK, Petersen FC. Identification of a functional capsule locus in *Streptococcus mitis*. Mol Oral Microbiol. 2012;27(2):95-108.

Sabella C, Murphy D, Drummond-Webb J. Endocarditis due to *Streptococcus mitis* with high-level resistance to penicillin and ceftriaxone. JAMA. 2001;285(17):2195.

Schlafer S, Raarup MK, Meyer RL, Sutherland DS, Dige I, Nyengaard JR, et al. pH landscapes in a novel five-species model of early dental biofilm. PLoS One. 2011;6(9):e25299.

Schlafer S, Meyer RL, Sutherland DS, Stadler B. Effect of Osteopontin on the initial adhesion of dental bacteria. J Nat Prod. 2012;75(12):2108-12.

Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses. 2005;48(6):365-77.

Stenfors Arnesen L, Granum PE, Buisson C, Bohlin J, Nielsen-LeRoux C. Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 2011;317(2):196-202.

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

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

Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc. 2006;137 Suppl:10S-15S.

Tu Y, Huang W, Pan Z, Hu H, Chen H. Effect of *Streptococcus sanguinis*/*Porphyromonas gingivalis* single and combined biofilms upon platelet aggregation. Oral Dis. 2012;18(6):586-94.

Uzeda M. Microbiologia oral. Rio de Janeiro: MEDSi, Ed. Médica Científica Ltda; 2002. 104p.

Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Braz Dent J. 2006;17(3):223-7.

Vilela SFG. Influência de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilme formado por *Candida albicans* *in vitro* e infecção em modelo de invertebrado [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

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

Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. Cell Microbiol. 2013;17.

Yamaguchi M, Terao Y, Ogawa T, Takahashi T, Hamada S, Kawabata S. Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. Microbes Infect. 2006;8(12-13):2791-6.

Yasmin A, Kenny JG, Shankar J, Darby AC, Hall N, Edwards C, et al. Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. J Bacteriol 2010; 192(4):1122-30.

Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. MBio. 2014 Aug 5;5(4):e01333-14

Zhang L, Mah TF. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. J Bacteriol. 2008;190(13):4447-52.

Zheng LY, Itzek A, Chen ZY, Kreth J. Oxygen dependent pyruvate oxidase expression and production in *Streptococcus sanguinis*. Int J Oral Sci. 2011;3(2):82-9.

Zhu L, Kreth J. Role of *Streptococcus mutans* eukaryotic-type serine/threonine protein kinase in interspecies interactions with *Streptococcus sanguinis*. Arch Oral Biol. 2010;55(5):385-90.

Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. PLoS One. 2010; 24;5(2):e9321.

Zoumpopoulou G, Pepelassi E, Papaioannou W, Georgalaki M, Maragkoudakis PA, Tarantilis PA, et al. Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens. Int J Mol Sci. 2013;26;14(3):4640-54.