



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

IDIA NARA DE SOUSA VERAS

**ANÁLISE DO PERFIL MORFOLÓGICO DE *Candida tropicalis* DURANTE A
FORMAÇÃO DO BIOFILME SOB INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS
EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Streptococcus***

SOBRAL

2014

IDIA NARA DE SOUSA VERAS

**ANÁLISE DO PERFIL MORFOLÓGICO DE *Candida tropicalis* DURANTE A
FORMAÇÃO DO BIOFILME SOB INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS
EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Streptococcus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus de Sobral*

-
- V584a Veras, Idia Nara de Sousa.
Análise do perfil morfológico de *Candida tropicalis* durante a formação do biofilme sob influência de metabólitos extracelulares de bactérias do gênero *Streptococcus*. / Idia Nara de Sousa Veras. – 2014.
77 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.
Área de Concentração: Microbiologia.
Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.
1. *Candida tropicalis*. 2. *Streptococcus oralis*. I. Título.

CDD 579

IDIA NARA DE SOUSA VERAS

**ANÁLISE DO PERFIL MORFOLÓGICO DE *Candida tropicalis* DURANTE A
FORMAÇÃO DO BIOFILME SOB INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS
EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Streptococcus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof^a. Dr^a. Theodora Thays Arruda Cavalcante
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Dedico este trabalho aos meus pais Luiza e
Miguel, minha querida irmã Ana Luisa e a
minha sobrinha Maria Eullalia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a oportunidade de realizar mais uma conquista e pelas pessoas maravilhosas que encontrei no decorrer desta jornada.

Aos meus pais, Luiza Sousa e Miguel Veras, meus alicerces, minha força para ultrapassar todos os obstáculos impostos pela vida. A minha irmã Ana Luisa Veras, sempre presente, trazendo leveza até nos momentos mais difíceis dessa caminhada. E ao meu irmão Márcio Veras.

A toda minha família, em especial a minha tia Antonia Lima pelo apoio, carinho, compreensão, palavras de fé e conforto em todos os momentos, sejam eles fáceis ou difíceis.

À minha sobrinha Maria Eullalia Veras, a quem amo muito, por trazer mais alegria a minha vida.

Ao Prof. Dr. Victor Alves Carneiro, meu orientador, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança e os inúmeros desafios que me proporcionaram uma evolução tanto científica quanto pessoal. Além de um exemplo de dedicação e competência a ser seguido. Obrigada por tudo.

Aos professores, Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, Dr^a Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle e a Dr^a Theodora Thays Arruda Cavalcante pela valorosa participação na banca examinadora.

Às minhas queridas amigas, Ariana Vasconcelos e Simone Torres, pelo auxílio, companheirismo, paciência e ensinamentos durante todo esse período. Vocês foram meu apoio de todos os momentos. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas incríveis no meu caminho. Essa conquista também é de vocês. A vocês meninas, minha eterna gratidão, admiração e amizade.

Às ‘coagregadas’: Wanderléia Policarpo, Marianne Pontes e Humberlânia Duarte por todos os momentos compartilhados, sejam eles de risos ou de dificuldades.

Às minhas companheiras e amigas de apartamento Livânia Linhares e Lidiane Linhares pelo convívio diário, apoio, compreensão e momentos de descontração.

A todos os meus amigos, especialmente a Érica Rabelo, Jardelina Torres (‘chefe’) e Graciela Ferreira que sempre estiveram ao meu lado, torceram, incentivaram e me apoiaram em todos os momentos dessa jornada.

Aos professores do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará por todos os conhecimentos partilhados.

Aos colegas de turma do mestrado: Ariana Vasconcelos, Simone Torres, Raulzito Fernandes, Débora Freitas, Kátia Ribeiro, Francisco Socorro, Tiago Santos, Tânia Lopes, Taiã Gomes, Thales Pinheiro e Sérgio Ponte.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) por toda a estrutura e suporte disponibilizados, em particular ao grupo de biofilmes e todos os seus integrantes.

À Universidade Federal do Ceará, especialmente a Faculdade de Medicina *Campus Sobral* e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por me fornecerem as condições acadêmicas necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro a este projeto.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não
sou como era antes.”

(Marthin Luther King)

RESUMO

Bactérias e fungos são encontrados juntos em uma infinidade de ambientes e, particularmente, na forma de biofilme, onde as espécies aderentes interagem através de diversos mecanismos de sinalização. Na cavidade oral, espécies de *Candida* coexistem com inúmeras espécies bacterianas, e evidências sugerem que bactérias podem modular a formação de biofilme, bem como induzir a formação de hifas e pseudo-hifas. Assim, caracterizar tais interações é essencial para o entendimento da patogênese das doenças e, possivelmente, a descoberta de novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os mecanismos envolvidos na interação entre as bactérias *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* e a levedura *Candida tropicalis*. No estudo foi analisado o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *C. tropicalis* (SCT) sobre o biofilme pré-formado (6h) de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*. Também foi avaliado o efeito dos metabólitos extracelulares de *S. oralis* (SSO), *S. sanguinis* (SSS) e *S. parasanguinis* (SSP) sobre o crescimento planctônico, formação de biofilme e capacidade de filamentação de *C. tropicalis*, utilizando apenas o sobrenadante da cultura de cada um dos estreptococos em diferentes concentrações (100, 50 e 25%). Além disso, foi analisado o efeito dos metabólitos extracelulares dos estreptococos sobre o biofilme pré-formado (6h) de *C. tropicalis*. Para verificar o efeito dos metabólitos extracelulares foram utilizados dois métodos: o método turbidimétrico que se baseia na leitura da densidade óptica (OD) das suspensões celulares e a coloração cristal violeta (CV) que permite a quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração com cristal violeta. Em seguida, foram examinadas as características dos biofilmes, formados por 24 horas, através da análise por microscopia óptica comum. Os resultados referentes ao biofilme foram submetidos ao ANOVA com pós-teste Bonferroni, com diferença estatística de $p<0,01$. Nossos resultados sugerem que substâncias solúveis produzidas por *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* induzem a formação de hifas de *C. tropicalis* sem interferir no crescimento planctônico. Além de diminuir drasticamente o desenvolvimento do biofilme dessa levedura quando em contato com SSS e SSP. Tal fato reforça a ideia de que existe grande heterogeneidade dentro de biofilmes polimicrobianos, especialmente entre leveduras e bactérias. E que o resultado dessa interação depende das condições as quais estes micro-organismos serão submetidos.

Palavras-chave: Biofilme. *Candida tropicalis*. Interação fungo-bactéria. *Streptococcus oralis*. *Streptococcus parasanguinis*. *Streptococcus sanguinis*.

ABSTRACT

Bacteria and fungi are found together in a multitude of environments, and particularly in the form of biofilm adherent species which interact through various signaling mechanisms. In the oral cavity, *Candida* species coexist with numerous bacterial species, and evidence suggests that bacteria can modulate biofilm formation as well as induce the formation of hyphae. Thus, to characterize such interactions are essential to the understanding of pathogenesis of diseases and possibly the discovery of new therapeutic strategies. In this sense, the main objective of this study was to evaluate, *in vitro*, the mechanisms involved in the interaction between bacteria *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, and *Streptococcus parasanguinis* yeast *Candida tropicalis*. In the study the effect of extracellular metabolites present in the supernatant of *C. tropicalis* (SCT) on the pre-formed biofilm (6H) *S. oralis*, *S. sanguinis* and *S. parasanguinis* was analyzed. The effect of extracellular metabolites of *S. oralis* (SSO), *S. sanguinis* (SSS) and *S. parasanguinis* (SSP) on planktonic growth and biofilm formation capacity filamentation of *C. tropicalis* was also evaluated using only the supernatant culturing each of streptococci in different concentrations (100, 50 and 25%). Furthermore, the effect of extracellular metabolites of streptococci on the pre-formed biofilm (6h) of *C. tropicalis* were analyzed. To verify the effect of extracellular metabolites two methods were used: The turbidimetric method based on the reading of the optical density (OD) of cell suspension and coloring crystal violet (CV) which permits indirect quantification of the biofilm formation by staining with crystal violet. Then were examined characteristics of biofilms formed by 24 hours, through the analysis simple optical microscope. The results for the biofilm were subjected to ANOVA with Bonferroni post-test, with a statistical difference of $p<0.01$. Our results suggest that soluble substances produced by *S. oralis*, *S. sanguinis* and *S. parasanguinis* induce the formation of hyphae of *C. tropicalis* without interfering with planktonic growth. In addition to dramatically decrease biofilm development of oral yeast when in contact with SSP and SSS. This reinforces the idea that there is great heterogeneity within polymicrobial biofilms, especially between yeasts and bacteria. And the result of this interaction depends on the conditions which these micro-organisms will be subjected.

Keywords: Biofilm. Bacteria-fungal interaction. *Candida tropicalis*. *Streptococcus oralis*. *Streptococcus pasanguinis*. *Streptococcus sanguinis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação de um modelo geral da formação de um biofilme bacteriano.....	21
Figura 2-	Representação didática da origem dos principais constituintes da película adquirida do esmalte.....	25
Figura 3-	Representação esquemática do modelo espaço temporal da colonização bacteriana na cavidade oral.....	27
Figura 4-	Representação didática da parede celular de <i>C. albicans</i> mostrando os principais componentes da parede celular e suas distribuições.....	34
Figura 5-	Representação dos estágios de formação de um biofilme de <i>C. albicans</i> na superfície de um cateter	38
Figura 6-	Representação didática das interações entre fungos e bactérias.....	42
Figura 7-	Desenho esquemático do planejamento experimental para verificar o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de SCT sobre o biofilme pré-formado de <i>S. oralis</i> , <i>S. sanguinis</i> e <i>S. parasanguinis</i>	52
Figura 8 -	Desenho esquemático do preparo dos sobrenadantes 100, 50 e 25%..	53
Figura 9 -	Desenho esquemático do planejamento experimental para quantificar o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadantes de SSO, SSS e SSP sobre o crescimento planctônico de <i>C. tropicalis</i> e biofilme 24 horas.....	54
Figura 10 -	Desenho esquemático do planejamento experimental para verificar o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de SSO, SSS e SSP sobre o biofilme pré-formado de <i>C. tropicalis</i>	55
Figura 11 -	Avaliação do efeito do SCT sobre o desenvolvimento do biofilme de <i>S. oralis</i> , <i>S. sanguinis</i> e <i>S. parasanguinis</i>	59
Figura 12 -	Avaliação do crescimento planctônico de <i>C. tropicalis</i> quando em contato com SSO, SSS e SSP em diferentes concentrações.....	60

Figura 13 - Avaliação da formação do biofilme de <i>C. tropicalis</i> quando em contato com SSO, SSS e SSP em diferentes concentrações.....	61
Figura 14 - Imagens de microscopia óptica comum (aumento de 40X). Biofilmes formados por 24 h. (A) <i>C. tropicalis</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> + SSO; (C) <i>C. tropicalis</i> + SSS; (D) <i>C. tropicalis</i> + SSP. Sobrenadante 100%.....	61
Figura 15 - Imagens de microscopia óptica comum (aumento de 40X). Biofilmes formados por 24 h. (A) <i>C. tropicalis</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> + SSO; (C) <i>C. tropicalis</i> + SSS; (D) <i>C. tropicalis</i> + SSP. Sobrenadante 50%.....	62
Figura 16 - Imagens de microscopia óptica comum (aumento de 40X). Biofilmes formados por 24 h. (A) <i>C. tropicalis</i> ; (B) <i>C. tropicalis</i> + SSO; (C) <i>C. tropicalis</i> + SSS; (D) <i>C. tropicalis</i> + SSP. Sobrenadante 25%.....	62
Figura 17 - Avaliação do efeito do SSO, SSS e SSP sobre o biofilme pré-formado (6 h) de <i>C. tropicalis</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma

μL – Microlitro

mL – Mililitro

μM – Micrômetro

nm – Nanômetro

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

AMP cíclico (AMPc) – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AI-2 – Autoinducer-2

BHI – Brain Heart Infusion

CNA – *Candida* não-*albicans*

CV – Cristal violeta

CO_2 – Gás carbônico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTT – Ditiotreitol

DO – Densidade Óptica

EPS – Substância polimérica extracelular

GlcNAc – *N*-acetilglucosamina

GPDH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

IgA – Imunoglobulina A

Log – logarítmica

MAP quinase – Proteína quinase ativada por mitógenos

PAE – Película adquirida do esmalte

PKA – Proteína quinase A

PRPs – Proteínas ricas em prolina

P.A. – Para análise

pH – Potencial Hidrogeniônico

QS – *Quorum sensing*

SAPs – Proteinases aspartil secretadas

SCT – Sobrenadante de *Candida tropicalis*

SSO – Sobrenadante de *Streptococcus oralis*

SSS – Sobrenadante de *Streptococcus sanguinis*

SSP – Sobrenadante de *Streptococcus parasanguinis*

SDB – Sabouraud Dextrose Broth

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UTIs – Unidades de terapia intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$ – Porcentagem

α – Alfa

β – Beta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1	INTRODUÇÃO.....	17
---	-----------------	----

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA – BIOFILMES

2	BIOFILMES.....	20
2.1	Aspectos gerais.....	20
2.2	Biofilmes orais.....	21
2.2.1	<i>Cavidade oral</i>	21
2.2.2	<i>Importância da saliva</i>	22
2.2.3	<i>Película adquirida do esmalte (PAE)</i>	24
2.3	O processo de formação dos biofilmes orais: da aderência à dispersão.....	26

CAPÍTULO 3 – REVISÃO DE LITERATURA – LEVEDURAS DO

GÊNERO *Candida*

3	LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	32
3.1	<i>Candida tropicalis</i>	35
3.2	Adesão e formação do biofilme de <i>Candida</i>	36

CAPÍTULO 4 – REVISÃO DE LITERATURA – INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS E BACTÉRIAS

4	INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS E BACTÉRIAS.....	41
4.1	Interação entre estreptococos orais e <i>Candida</i>	44
4.2	Estratégias biotecnológicas de uso de subprodutos bacterianos para inibição da formação e desenvolvimento de biofilmes.....	45

CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS

5	OBJETIVOS.....	48
5.1	Objetivo geral.....	48
5.2	Objetivos específicos.....	48

CAPÍTULO 6 – MATERIAIS E MÉTODOS

6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
6.1	Cepas utilizadas.....	50
6.2	Cultivo dos micro-organismos.....	50
6.3	Preparação da saliva.....	50

6.4	Preparação de sobrenadantes livres de células.....	51
6.5	Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de <i>C. tropicalis</i> (SCT) no biofilme pré-formado de <i>S. oralis</i>, <i>S. sanguinis</i> e <i>S. parasanguinis</i>.....	51
6.6	Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de <i>S. oralis</i> (SSO), <i>S. sanguinis</i> (SSS) e <i>S. parasanguinis</i> (SSP) no crescimento planctônico e biofilme de <i>C. tropicalis</i>.....	52
6.6.1	<i>Preparo dos sobrenadantes 100, 50 e 25%</i>.....	52
6.6.2	<i>Quantificação do efeito dos metabólitos extracelulares</i>.....	53
6.7	Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de <i>S. oralis</i> (SSO), <i>S. sanguinis</i> (SSS) e <i>S. parasanguinis</i> (SSP) no biofilme pré-formado de <i>C. tropicalis</i>.....	54
6.8	Quantificação da biomassa.....	55
6.9	Microscopia óptica.....	56
6.10	Análise estatística dos ensaios microbiológicos.....	56
CAPÍTULO 7– RESULTADOS E DISCUSSÃO		
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
7.1	Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de <i>C. tropicalis</i> (SCT) no biofilme pré-formado (6h) de <i>S. oralis</i>, <i>S. sanguinis</i> e <i>S. parasanguinis</i>.....	58
7.2	Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de <i>S. oralis</i> (SSO), <i>S. sanguinis</i> (SSS) e <i>S. parasanguinis</i> (SSP) no crescimento planctônico e biofilme de <i>C. tropicalis</i>.....	60
7.3	Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de <i>S. oralis</i> (SSO), <i>S. sanguinis</i> (SSS) e <i>S. parasanguinis</i> (SSP) no biofilme pré-formado (6h) de <i>C. tropicalis</i>.....	65
CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES		
8	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

Capítulo 1 – Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os estudos sobre as comunidades microbianas têm voltado seus olhares para a análise das complexas interações que ocorrem entre micro-organismos da mesma espécie e espécies distintas durante a formação de comunidades microbianas estruturadas denominadas biofilmes. Desta forma, a noção de micro-organismo como uma célula planctônica, vivendo de forma isolada foi praticamente eliminada (FALSETA; KOO, 2014).

O biofilme é o modo predominante de desenvolvimento escolhido pelos micro-organismos na maioria dos ambientes. Os biofilmes são formados por milhões de células bacterianas envolvidas por uma matriz polimérica e ligadas a uma superfície biótica ou abiótica. O crescimento na forma de biofilme protege as células microbianas contra dessecação, predadores, ação do sistema imune do hospedeiro e de antibióticos. Os biofilmes são a maior causa de infecções crônicas graves (BENDAOUD *et al.*, 2011).

Embora infecções causadas por uma única espécie de micro-organismo forneçam informações importantes sobre a patogênese de infecções microbianas, estas, muitas vezes são o resultado da colonização e interação de várias espécies, dentre estas bactérias e fungos (RAMSEY; RUMBAUGH; WHITELEY, 2011).

Interações entre procariotos e eucariotos são ubíquos. Embora relações patogênicas e simbióticas entre bactérias, plantas e animais sejam as mais conhecidas e estudadas, este tipo de relação entre micro-organismos são, provavelmente, mais comuns. Bactérias e eucariotos unicelulares, como as leveduras, são encontrados juntos em diferentes ambientes e podem apresentar interações de sinergismo e antagonismo (HOGAN; KOLTER, 2002).

As bactérias, entre estas se incluem os estreptococos orais, são frequentemente encontradas com espécies de *Candida* em biofilmes polimicrobianos *in vivo* (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009). Os estreptococos orais são um grupo de bactérias denominado como colonizadores iniciais, que podem se aderir à superfície do esmalte revestida por saliva e servir de ancoragem para subsequente colonização de outros micro-organismos. Apesar de comensais, contribuem para o desenvolvimento e patogênese de comunidades microbianas mistas (JANG *et al.*, 2013).

Candida tropicalis é comumente encontrada na microbiota normal de seres humanos, no entanto, mudanças no ambiente e no binômio parasita-hospedeiro tornam esta levedura capaz de invadir o organismo hospedeiro e consequentemente causar infecções

graves. Por ser um organismo que apresenta dimorfismo pode apresentar-se, em interação com o hospedeiro, sob a forma de levedura e hifas ou pseudo-hifas. Esta capacidade de filimentação é um importante passo para sua virulência (HOGAN; KOLTER, 2002).

Dentre os ambientes habitados pelos micro-organismos, a cavidade oral é colonizada por uma gama de espécies microbianas diferentes, e a maioria delas reside na forma de biofilmes. Devido a essa diversidade, a comunidade microbiana oral é um dos melhores modelos de biofilme polimicrobiano para se estudar as interações entre espécies (JAROSZ *et al.*, 2009).

Os micro-organismos são, em sua maioria, associados a aspectos negativos, especialmente quando falamos de saúde. De fato, os micro-organismos são agentes causadores de infecções graves. Porém, muitos deles contribuem com a saúde humana, um exemplo disso é a produção de medicamentos, disponíveis para o tratamento de diversas doenças, inclusive infecções bacterianas (CARVALHO; ABRAHAN; MACEDO, 2008).

A natureza oferece uma gama de produtos com propriedades antimicrobianas que podem ser exploradas e valorizadas nos vários setores de atividade humana. Os agentes antimicrobianos naturais podem ser de origem animal, vegetal, humana e microbiana. As bactérias são micro-organismos com capacidade para produzir uma grande variedade de compostos antimicrobianos, sendo alguns destes produtos finais de fermentação, bacteriocinas e biotensoativos. Dentre estes, as bacteriocinas são os agentes de maior importância (SOUSA; COELHO; PEREIRA, 2012).

Muitos biofilmes liberam moléculas, tais como sinais de *quorum sensin* (QS), surfactantes, enzimas e polissacarídeos que atuam como reguladores da arquitetura e comunicação célula à célula dentro do biofilme; podem também mediar a liberação de células do biofilme durante a fase de dispersão. Estes compostos, normalmente apresentam um amplo espectro de atuação, seja inibindo ou ativando o desenvolvimento do biofilme. Tais compostos podem representar uma fonte alternativa para o desenvolvimento de estratégias contra os biofilmes e as consequentes infecções ocasionadas por eles (BENDAOUD *et al.*, 2011).

Dessa forma, compreender as interações que ocorrem entre os organismos que formam biofilmes e o ambiente que os circunda, provavelmente, pode ser a chave na tentativa de controle dos mesmos, visto que esses trazem muitos prejuízos, especialmente na área da saúde (FALSETA; KOO, 2014).

Capítulo 2 – Revisão de literatura

Biofilmes

2 Biofilmes

2.1 Aspectos gerais

Na natureza, os micro-organismos raramente vivem em colônias isoladas de uma única espécie, como podemos observar no laboratório. Mais tipicamente, eles vivem em comunidades chamadas de biofilmes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Biofilmes são conjuntos de micro-organismos envoltos por uma matriz extracelular (do inglês *Extracellular Polymeric Substances* – EPS) produzida pelos mesmos (McDOUGALD *et al.*, 2012). Cujas células expressam genes em um padrão, que difere de bactérias planctônicas (STOODLEY *et al.*, 2002). Estes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única espécie, ou de múltiplas espécies interagindo cooperativamente (MARSH; MARTIN, 2005).

À primeira vista, pode parecer contraditório que haja vantagens em viver na forma de biofilme, visto que as células associadas ao biofilme apresentam crescimento mais lento do que as células planctônicas. No entanto, fora do ambiente controlado do laboratório, os micro-organismos raramente crescem em ambientes repletos de nutrientes, e nestas condições, essa forma de crescimento em biofilme confere inúmeras vantagens a eles (CERCA; JEFFERSON, 2012; KUBONIWA *et al.*, 2012).

Desta forma, o biofilme amplia a fonte de energia para os micro-organismos, favorece o desenvolvimento de arranjos espaciais e movimento de nutrientes e subprodutos. Além disso, favorece uma ampla gama de habitats necessários ao crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos ali presentes, maior resistência aos agentes antimicrobianos e defesas do hospedeiro, bem como aumenta sua capacidade de causar doenças (SAINI; SAINI; SHARMA, 2011).

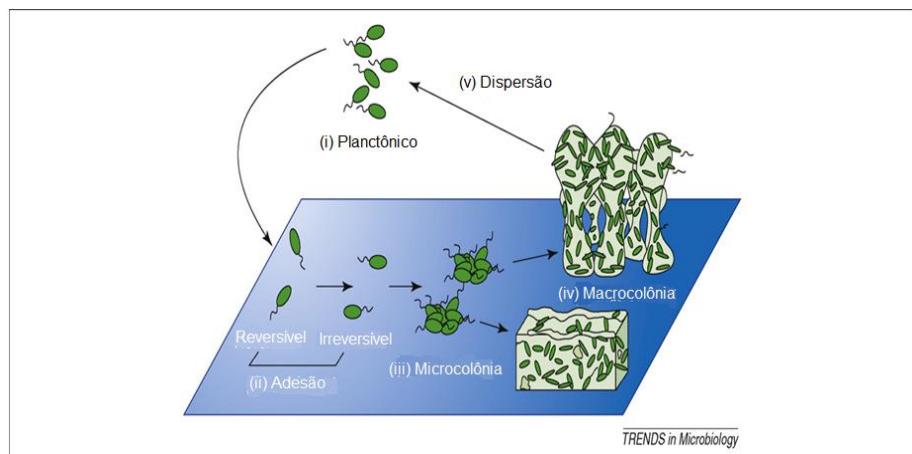
Os biofilmes exercem um grande impacto em muitos aspectos da vida dos seres humanos, uma vez que podem se formar em ambientes naturais, médicos e industriais. A formação de biofilmes em dispositivos médicos, tais como, cateteres ou implantes muitas vezes resultam em infecções crônicas difíceis de tratar. Além disso, infecções em diferentes partes do corpo humano, tais como dentes, pele e trato urinário estão associadas com a formação de biofilmes (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

O processo de formação de um biofilme é um evento complexo que requer a expressão coordenada e a regulação simultânea de vários genes de fixação tanto reversível

como irreversível, formação de microcolônias, formação de uma estrutura 3D estável e sua posterior dispersão (KUBONIWA *et al.*, 2012).

Deste modo, a formação de um biofilme (Figura 01) tem início quando células planctônicas se aderem a superfícies biológicas ou inertes. Os micro-organismos associados se multiplicam e formam microcolônias, estas crescem e se aglutanam para formar macrocolônias. Os micro-organismos são mantidos dentro das macrocolônias por uma matriz de exopolissacarídeo. Sob condições ambientais adequadas, células microbianas são liberadas dos biofilmes e o ciclo continua em outras superfícies. Cerca de 80% da biomassa microbiana existente no mundo reside sob a forma de biofilmes (MONDS; O'TOOLE, 2009; SUH; RAMAKRISHNAN; PALMER, 2010).

Figura 01: Representação de um modelo geral da formação de um biofilme dividido em fases operacionalmente identificadas como (i) planctônico, (ii) adesão, (iii) formação de microcolônias, (iv) macrocolônias e (v) dispersão.



Fonte: MONDS; O'TOOLE, 2009

A placa dentária humana é um dos sistemas de biofilmes mais complexos encontrados na natureza, pois está constantemente em contato com o ambiente e, portanto, podem ser usados como um modelo geral para o estudo da biologia de biofilmes (XIAO, *et al.*, 2012). Dentro do ambiente bucal, os biofilmes estão ligados a uma superfície sólida, como por exemplo, o esmalte dental, a superfície da raiz ou implantes dentários e são incorporados numa matriz de exopolissacarídeos (ZIJNE *et al.*, 2010).

2.2 Biofilmes Orais

2.2.1 Cavidade Oral

Todos nós vivemos do nascimento até a morte, rodeados por diferentes micro-organismos, muitos deles estão presentes no nosso organismo fazendo parte da nossa microbiota normal. Sendo a cavidade oral um ambiente que fornece condições adequadas à sobrevivência de uma grande e variada população microbiana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A cavidade oral apresenta características distintas de todas as outras superfícies do corpo e determinam que tipos de micro-organismos são capazes de ali permanecer, de modo que nem todos os micro-organismos apresentam aptidão para aderir-se e colonizar superfícies bucais (ALI; TANWIR, 2012).

Como porta principal para ingestão de água e alimentos, a cavidade oral está constantemente sob o ataque de micro-organismos do ambiente externo (CULP *et al.*, 2011). Os dentes são diferentes de todas as outras superfícies exteriores do corpo. Eles são duros e as células não se destacam da sua superfície. Isso permite o acúmulo de massas de micro-organismos e seus produtos. Esses acúmulos, denominados placas dentárias, é um tipo de biofilme e estão intimamente envolvidos na formação das cárries dentárias. Além de, em cada mililitro de saliva conter milhões de bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Dado que a cavidade oral é um sistema aberto em contato constante com micro-organismos provenientes do ambiente, será muito difícil determinar com exatidão todas as espécies que a compõem, definir as populações transientes e endógenas ou determinar as espécies comuns a todos os indivíduos. Contudo, estudos moleculares revelam que a cavidade oral é um ecossistema polimicrobiano com diferentes complexidades, no que se refere às espécies e sua distribuição, e que a maior parte das infecções orais é provocada por um consórcio entre micro-organismos (MARTINS; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2012).

2.2.2 Importância da saliva

A saliva, uma solução aquosa produzida pelas glândulas salivares constituída por elementos orgânicos e inorgânicos (NEYRAUD *et al.*, 2012), flui sobre todas as superfícies internas da cavidade oral. Esta é produzida por três pares de glândulas salivares maiores, a parótida, a submandibular e a sublingual, e, também por glândulas salivares menores, a labial, a lingual, a vestibular e a palatina. Existem algumas diferenças na composição química nas secreções de cada uma delas, mas sua combinação é denominada saliva total (MARSH; MARTIN, 2005). A regulação da secreção das glândulas salivares está sob o controle dos sistemas nervoso autônomo simpático e parassimpático (NEYRAUD *et al.*, 2012).

Na cavidade oral, a saliva participa do processo de mastigação, da fala, da deglutição, da sensibilidade gustativa, da lubrificação dos tecidos, regulação do balanço iônico, na remineralização do esmalte, deposição da película adquirida do esmalte e limitação da difusão de ácidos, além de manter a saúde oral, fornecendo proteção imunológica contra micro-organismos patogênicos (CARRILLO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2010).

O microbioma oral humano é complexo por natureza. Este é composto por bactérias e fungos que colonizam os mais diferentes habitats da boca (como lábios, bochechas, palato, língua e dentes). Verificou-se que cerca de 700 espécies de bactérias encontram-se na cavidade oral (ALI; TANWIR, 2012).

Membros do domínio *Eukarya*, nomeadamente o reino *Fungi*, tem sido associado a lesões orais, sendo a *Candida albicans* a espécie mais frequente. No entanto, os fungos também são encontrados na cavidade oral de indivíduos saudáveis, mas se tratando do domínio *Bacteria*, seus membros são os que mais frequentemente colonizam a cavidade oral e estão associados a infecções (MARTINS; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2012).

Para a microbiota, a saliva é considerada uma “faca de dois gumes”. Se por um lado ela oferece excelentes condições ambientais para as bactérias (temperatura, pH, umidade dentre outros), por outro, existem, na saliva, vários mecanismos que limitam o desenvolvimento microbiano, principalmente as substâncias antimicrobianas, alterações prolongadas de pH e ação mecânica de lavagem (fluxo salivar) (LORENZO, 2004).

A água é o maior constituinte da saliva, representando cerca de 99% de sua composição. Os componentes orgânicos e inorgânicos, são encontrados dissolvidos no componente aquoso e podem variar consideravelmente de um indivíduo para o outro, podendo ainda variar no mesmo indivíduo várias vezes durante o dia (LIMA *et al.*, 2010).

O aumento do fluxo salivar permite maior disponibilidade dos constituintes orgânicos e inorgânicos, podendo atuar na prevenção da cárie. Ao passo que a perda da função salivar é prejudicial à saúde bucal podendo ser associada com o desenvolvimento de lesões cariogênicas (HARA; ZERO, 2010).

Os constituintes salivares inorgânicos de maior interesse são o cálcio, o fosfato, o potássio e o bicarbonato. Esses íons estão associados com a manutenção da integridade dos processos de desmineralização/remineralização e o sistema tampão da saliva, especialmente o bicarbonato (HARA; ZERO, 2010).

Dentre os constituintes orgânicos da saliva podemos encontrar agentes antimicrobianos, como a imunoglobulina A (IgA), a lisozima, a lactoferrina e a lactoperoxidase, as quais podem estar relacionadas com a cárie. A saliva também é constituída

por proteínas, que podem regular os processos de desmineralização e remineralização envolvidos no desenvolvimento e interrupção do processo cariogênico. Estaterinas, Proteínas ricas em prolina (PRPs), histatinas e cistatinas mostraram alta afinidade a superfície do esmalte e estão potencialmente envolvidas com a manutenção da integridade dos dentes. Desta forma, sugere-se que essas proteínas salivares podem fornecer proteção contra a desmineralização (HARA e ZERO, 2010).

As interações saliva-bactéria são consideradas muito importantes para manutenção da microflora oral e para a formação da placa dentária. Os componentes salivares podem influenciar na formação das placas dentárias por diversos mecanismos. A ligação de constituintes salivares a micro-organismos pode reduzir a formação de placas, quando, por exemplo, facilitam o afastamento físico das bactérias da cavidade oral por meio de mecanismos bacteriostáticos ou bactericidas. Por outro lado, películas salivares podem promover a colonização microbiana, por meio de adesinas ou pelo fornecimento de nutrientes provenientes da quebra enzimática da saliva e, também pelos constituintes da dieta (ROGERS *et al.*, 2001).

2.2.3 Película adquirida do esmalte (PAE)

É cada vez mais evidente que a saliva desempenha um importante papel na formação da placa dentária, e existem numerosos exemplos de interações específicas entre os componentes salivares e as bactérias orais. De fato, é possível que as variações nas concentrações de alguns componentes da saliva podem influenciar o equilíbrio ecológico que podem favorecer ou inibir a colonização oral por bactérias responsáveis pela destruição dos tecidos (SCANNAPIECO, 1994).

Mecanismos de aderência de bactérias orais são essenciais para sua colonização ao ambiente oral. Na ausência destes, as bactérias tornam-se parte do fluxo salivar e são engolidas. Consequentemente, estas bactérias têm desenvolvido vários mecanismos capazes de desempenhar este papel, que são altamente específicos. Assim, a cavidade oral é colonizada, principalmente por bactérias que apenas são encontradas neste ambiente (WHITTAKER; KLIER; KOLENBRANDER, 1996).

As bactérias presentes na cavidade oral estão em contato constante com a saliva. Assim que um organismo entra na boca, é revestido com proteínas salivares específicas, o que pode proporcionar o aumento da adesão das bactérias aos tecidos orais. Além de fornecer receptores que proporcionam a adesão, a saliva pode agregar bactérias e também ajudar na sua

remoção. No que diz respeito às bactérias orais, estas reconhecem diferentes receptores dentro da película salivar (WHITTAKER; KLIER; KOLENBRANDER, 1996).

A película adquirida do esmalte (PAE, ou EAP – em inglês) é um filme biológico que cobre as superfícies dos dentes, formada pela adsorção seletiva de peptídeos e proteínas, principalmente as salivares (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). Podendo também existir moléculas provenientes do fluido crevicular gengival e de detritos bacterianos, como pode ser observado na figura 02 (MARTINS; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2012).

Quando este filme foi visto pela primeira vez, imaginou-se que era de origem embriológica. Apenas em meados do século XX é que ficou claro que este, somente é adquirido após a erupção do dente (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000).

A formação da película adquirida do esmalte é um processo altamente seletivo e dinâmico influenciado por vários fatores, compreendendo os ciclos circadianos, a composição da flora microbiana oral, a capacidade proteolítica da cavidade oral e as propriedades físicas e químicas da superfície do dente, bem como sua localização na boca (SIQUEIRA *et al.*, 2012).

Figura 02: Representação didática da origem dos principais constituintes da película adquirida do esmalte. Proteínas/peptídeos provenientes de glândulas salivares (no canto superior, à esquerda); proteínas/peptídeos provenientes de micro-organismos (no canto superior, à direita); proteínas/peptídeos provenientes da mucosa oral (no canto inferior, à esquerda); e, proteínas/peptídeos provenientes do fluido gengival (no canto inferior, à direita)



Fonte: SIQUEIRA *et al.*, 2012

A fase inicial de formação da PAE é acionada dentro de segundos de exposição à saliva. Proteínas salivares com elevada afinidade pela hidroxiapatita promovem o desenvolvimento da chamada “película precursora”, este processo se inicia através de interações eletrostáticas com a superfície do esmalte. Em estudos *in vitro*, as PRPs ácidas,

estaterinas e histatinas são identificadas como as primeiras a adsorver a hidroxiapatita. Além destas proteínas, estudos *in situ* confirmaram a presença de mucinas (MUC5B e MUC7), amilases, cistatinas, lisozima e lactoferrina como as proteínas mais abundantes da PAE (SIQUEIRA *et al.*, 2012).

A PAE proporciona uma superfície sobre a qual bactérias se aderem durante os estágios iniciais da formação de placa dentária (YAO *et al.*, 2001). E apesar da importância da PAE em processos patológicos, como a cárie dentária e a doença periodontal, pouco se sabe sobre a sua composição, estrutura e função (McDONALD *et al.*, 2011).

2.3 O processo de formação dos biofilmes orais: da aderência à dispersão

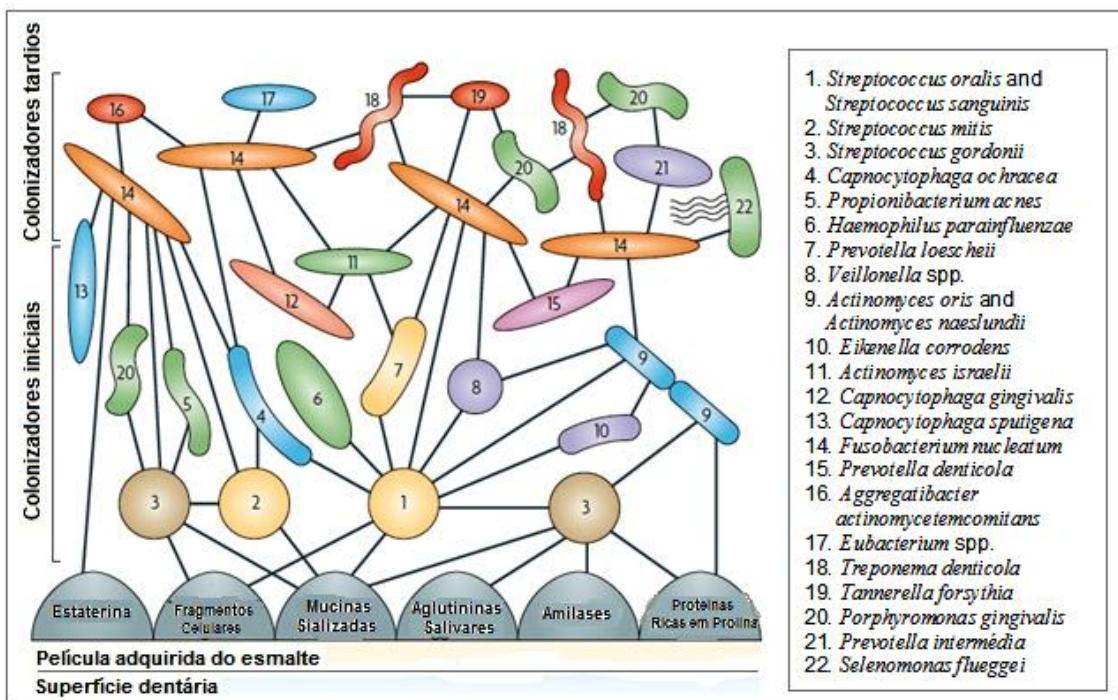
Embora as bactérias planctônicas sejam transportadas passivamente na saliva e no fluido crevicular, estas não estão em contato direto com a superfície do dente. Porém, podem estabelecer interações físico-químicas fracas e de longo alcance entre os micro-organismos e a PAE, o que facilita a adesão específica e irreversível das bactérias. Este processo ocorre através de interações entre as adesinas bacterianas e os receptores presentes na PAE (MARTINS; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2012).

No entanto, a fixação inicial é dinâmica e reversível, durante a qual as bactérias podem separar e reunir a população planctônica se esta for perturbada por forças hidrodinâmicas, forças repulsivas ou em resposta a disponibilidade de nutrientes (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento, a placa dental compreende predominantemente estreptococos orais e *Actinomyces*, que geralmente estão em harmonia com o hospedeiro. No entanto, mudanças populacionais levam ao aumento de micro-organismos acidófilos ou de anaeróbios gram-negativos na placa subgengival, que, respectivamente, contribuem para o aparecimento e progressão das doenças bucais mais comuns, a cárie e a doença periodontal (KUBONIWA *et al.*, 2012).

Os primeiros organismos que se ligam a PAE são os colonizadores primários, que à medida que o biofilme se desenvolve e em condições adequadas, podem multiplicar-se formando microcolônias, proporcionando mudanças nas condições ambientais, e consequentemente permitindo a agregação dos colonizadores secundários (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). É o que está didaticamente representado na figura que se segue (Figura 03).

Figura 03: Representação esquemática do modelo espaço temporal da colonização bacteriana na cavidade oral, mostrando as interações entre os receptores da PAE e os receptores moleculares presentes na superfície das bactérias, além das interações célula-célula presentes no biofilme.



Fonte: KOLENBRANDER *et al.*, 2010.

Dentre os colonizadores iniciais conhecidos pode-se destacar *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sobrinus* (LORENZO, 2004). Provavelmente a bactéria cariogênica mais importante é o *S. mutans*, um coco gram-positivo capaz de metabolizar uma variedade maior de carboidratos que qualquer outro organismo gram-positivo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

S. sanguinis e *S. parasanguinis* são bactérias gram-positivas, pertencentes a micraborta normal da cavidade oral. São colonizadores iniciais e estão envolvidos no desenvolvimento da placa dental. Após a adesão à superfície dental, juntamente com outros estreptococos atuam como um grupo de ancoragem para fixação de outros micro-organismos que formarão o biofilme dental, e contribuir para o desenvolvimento da cárie e doença periodontal (GARNETT *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2007). *S. sanguinis* é considerado um antagonista de *S. mutans*. Altos níveis de *S. mutans* na cavidade oral se correlacionam com baixos níveis de *S. sanguinis* (CHEN *et al.*, 2011).

Nos seres humanos, *S. oralis* é uma das espécies bacterianas comumente encontradas na boca saudável. É um colonizador inicial e que também está envolvida na formação da placa dentária. Este micro-organismo se adere ao esmalte dental através da

formação de polissacarídeos extracelulares e cresce em associação com *Actinomyces naeslundii* e outros membros da placa dental (CORCUERA *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao desenvolvimento do biofilme, bactérias do gênero *Fusobacterium* exibem mais parcerias do que qualquer outro gênero, isso porque *Fusobacterium nucleatum* coagrega com colonizadores iniciais e tardios, sendo assim importantes na sucessão de gêneros durante o desenvolvimento da placa dentária e consequentemente no desenvolvimento de biofilmes multiespécie (KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

A dispersão das células dos biofilmes e consequente colonização de locais distantes são importantes para a sobrevivência das células dispersas e constitui uma oportunidade de criar um novo foco de infecção (MARTINS; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2012). Este é um mecanismo que as bactérias desenvolveram para perceber mudanças ambientais e assim avaliar se ainda é benéfico residir no biofilme ou se é hora de retomar um estilo de vida planctônico. A dispersão do biofilme pode ser o resultado de vários estímulos, como por exemplo, alterações na disponibilidade de nutrientes, variações de oxigênio, aumento de produtos tóxicos ou outras condições de estresse (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). Nesse sentido, alguns estudos vêm associando bactérias orais a outras infecções, como a endocardite bacteriana (AZEVEDO; CERCA, 2012).

Os biofilmes microbianos possuem pelo menos uma característica em comum: a presença de uma matriz, que envolve as células e auxilia no processo de formação do biofilme. A composição e estrutura da matriz do biofilme podem ser tão variáveis como os componentes microbianos, além de sofrerem influências ambientais do local aonde irão se aderir, podendo ainda mudar ao longo do tempo (XIAO, *et al.*, 2012).

A matriz é o material extracelular, produzido pelos próprios organismos, no qual as células do biofilme são incorporadas. É composto por diferentes tipos de biopolímeros – conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) – que formam o suporte para a arquitetura tridimensional do biofilme (FLEMMING; WINGWNDER, 2010).

Estas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) são principalmente polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídios que por um lado fornecem a estabilidade mecânica do biofilme e também a sua adesão às superfícies, por outro formam uma armação para a arquitetura tridimensional que interliga e imobiliza as células do biofilme (ABEE *et al.*, 2011).

A matriz é considerada essencial para a existência do estilo de vida do biofilme e expressão completa da virulência de agentes bacterianos patogênicos (XIAO *et al.*, 2012). Ela também funciona como um centro de reciclagem, mantendo disponíveis todos os componentes das células lisadas. Dentre estes se inclui o DNA, que pode representar um reservatório de genes para posterior transferência horizontal (FLEMMING; WINGWNDER, 2010).

Dentro do hospedeiro, a matriz do biofilme protege bactérias contra a exposição às defesas do hospedeiro, tais como a opsonização e a fagocitose, e tratamentos com antibióticos. As interações interbacterianas podem promover a disseminação de mecanismos de resistência a medicamentos, além de outros fatores de virulência. Isso resulta em patógenos formadores de biofilmes persistentes e o estabelecimento de infecções crônicas e recorrentes (KOSTAKIOTO; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013).

No biofilme, a proximidade com a qual as bactérias se encontram permite que diversas interações se estabeleçam. Estas podem ser por contato (adesina-receptor), através de metabólitos, por meio de sinergismo ou antagonismo, por mecanismos de *quorum sensing* (QS), que é amplamente distribuído entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ou por transferência genética (JANG; JUN; CHOI, 2013; MARTINS; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2012).

Autoinducer-2 (AI-2) é uma importante molécula QS presente em bactérias orais e desempenha um importante papel na formação do biofilme. Esta permite a comunicação entre espécies em comunidades bacterianas mistas, além de regular a expressão genética que afeta vários fenótipos, incluindo virulência, adesão e formação do biofilme. Sua produção tem sido relatada em estreptococos orais como, por exemplo, *S. gordonii*, *S. oralis* e *S. mutans* (JANG; JUN; CHOI, 2013).

A interação física entre as células bacterianas de tipos de células geneticamente distintas ocorre com todas as centenas de estirpes bacterianas orais humanas. Quando ocorrem estas interações entre as células em suspensão, o processo é chamado de coagregação. Quando ocorrem entre as células em suspensão e já ligadas ao biofilme, é chamado de coadesão. Ambos são definidos como interações célula-célula específicos entre células geneticamente distintas, por exemplo, entre as bactérias orais *Prevotella loescheii* e *Streptococcus sanguinis*. Estes dois tipos de interações físicas fornecem justaposição de células para permitir a comunicação através da sinalização e de transferência de material genético no biofilme (KOLENBRANDER, 2000; KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

Muitas vezes, uma espécie pode coagregar com múltiplos parceiros, que pode se agregar a outros parceiros para formar uma placa bacteriana densa. Essa heterogeneidade apresentada pelos biofilmes constitui uma estratégia de sobrevivência importante, isso porque, essas células apresentam uma variedade de estados metabólicos, assim, é quase certo que irão resistir a qualquer ataque metabólico dirigido a eles (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Capítulo 3 – Revisão de literatura

Leveduras do gênero Candida

3 Leveduras do gênero *Candida*

Nos últimos 30 anos, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas em seres humanos. Dos fungos considerados como agentes patogênicos humanos, os membros do gênero *Candida* são os mais frequentemente isolados desse tipo de infecção (SILVA *et al.*, 2012). O gênero é composto por um grupo heterogêneo de organismos, tendo mais de 17 espécies de *Candida* conhecidas como agentes etiológicos de infecções humanas, no entanto, cerca de 90% das infecções fúngicas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SARDI *et al.*, 2013).

Espécies do gênero *Candida* estão presentes na microbiota normal do corpo humano e de animais. Estas colonizam a cavidade oral, o trato gastrointestinal, o sistema urinário, a vagina e a pele (SARDI *et al.*, 2013; SILVA, 2011). *C. albicans* é considerada a maior responsável pelos casos de candidíase e, como tal, tem sido a mais estudada nos últimos anos. Esta espécie apresenta dimorfismo, podendo apresentar-se na forma unicelular (levedura) ou na forma filamentosa (forma alongada), como as hifas ou pseudo-hifas (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012).

As infecções fúngicas provocadas por espécies de *Candida* são a principal causa de morbidade e mortalidade hospitalar, sendo que, tal como referido, *C. albicans* é a mais frequentemente isolada de pacientes com candidíase sistêmica. No entanto, espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, que anteriormente não eram consideradas patogênicas, emergiram como a segunda ou terceira espécies de *Candida* capazes de causar candidemia e candidíase sistêmica em pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos (CRUZ *et al.*, 2012).

O aumento na incidência de infecções fúngicas geralmente está associado ao crescente uso de dispositivos médicos, como implantes, próteses e cateteres, bem como o excessivo uso de agentes antimicrobianos, ao envelhecimento da população e ao aparecimento cada vez maior de pacientes imunocomprometidos (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012).

Além dos fatores inerentes ao hospedeiro, a patogenicidade de espécies de *Candida* está ligada a determinados fatores de virulência como, por exemplo, a capacidade de enganar o sistema imune do hospedeiro, e isso se deve ao fato de apresentarem dimorfismo, aderência e formação de biofilmes tanto no tecido do hospedeiro como em dispositivos médicos. Além disso, o sinergismo com bactérias e a produção de enzimas hidrolíticas que causam danos aos tecidos ou outros metabólitos também tem sido propostos como importantes fatores de virulência destes fungos (NIKAWA *et al.*, 2006; SARDI *et al.*, 2013).

Por apresentarem dimorfismo, as espécies de *Candida* podem crescer tanto sob a forma de levedura como sob a forma filamentosa (hifa ou pseudo-hifa). Sendo que a maioria se apresenta na forma filamentosa em meios com baixas concentrações de glicose e elevadas concentrações de CO₂. Ao contrário, a predominância na forma de levedura prevalece quando estas espécies crescem em meios com altas concentrações de glicose e baixas concentrações de CO₂ (CARDOSO, 2004).

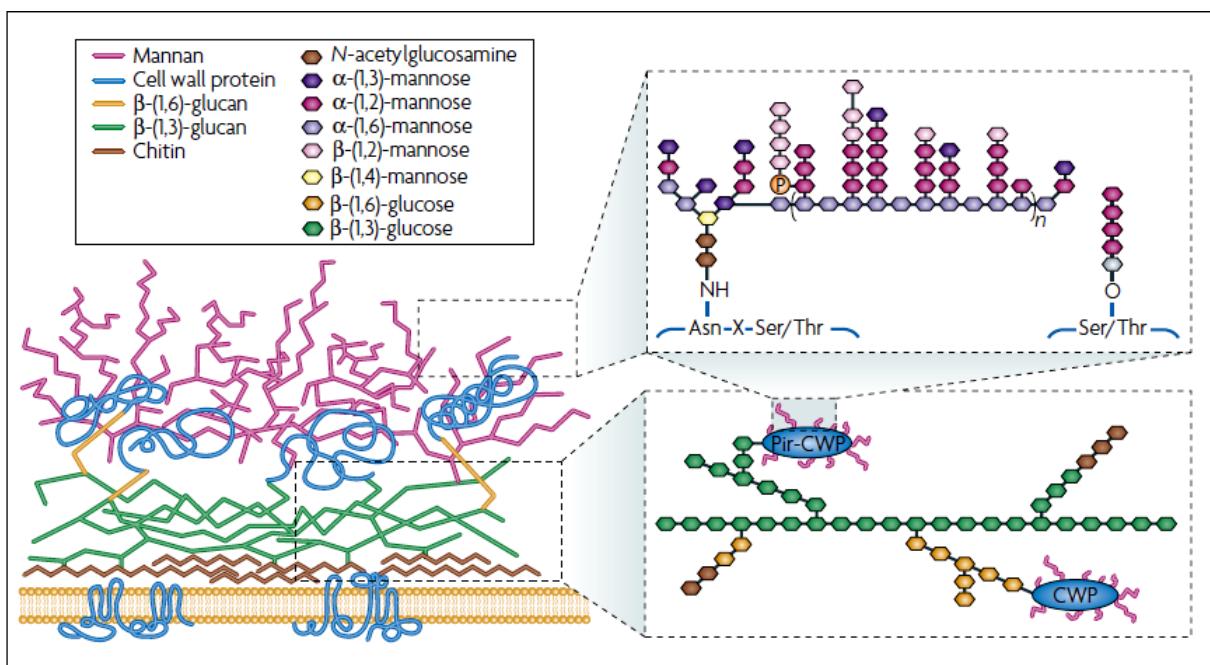
A formação de hifas é influenciada por uma cascata de sinalização central, a AMPc/via proteína quinase A (PKA). A *C. albicans* possui uma única adenililciclase, a Cyr1p. A indução para formação de hifas ativa essa enzima, aumentando os níveis de AMPc intracelular, que posteriormente ativa PKA. Esta via desencadeia a expressão de genes específicos para o desenvolvimento de hifas. A deleção de Cyr1p suprime completamente o desenvolvimento de hifas, além de retardar o crescimento de leveduras. Cyr1p também pode estar envolvido diretamente na detecção de sinais, onde o domínio catalítico de Cyr1p atua como um sensor de CO₂. Além disso, estudos sugerem que Cyr1p também pode detectar moléculas de QS (XU *et al.*, 2008).

No que se refere à membrana plasmática das leveduras o ergosterol é o esterol predominante, este é análogo ao colesterol presente nas células dos mamíferos. Esta molécula é importante para o desenvolvimento de diversas funções celulares, dentre elas a modulação da espessura, fluidez e permeabilidade da membrana plasmática das leveduras, com isso permitem que muitas das enzimas da membrana possam exercer corretamente sua função, como por exemplo, a síntese de quitina, importante para a divisão e crescimento da célula (CARDOSO, 2004; SGHERRI *et al.*, 2014).

Com relação à parede celular das leveduras, esta possui quantidades significativas de polissacarídeos como β -glucano, quitina e manana (covalentemente ligados a manoproteínas) em sua composição. Os componentes da parede celular de *Candida* podem ser divididos em duas camadas, onde uma camada exterior é composta por glicoproteínas e uma camada interna que possui uma estrutura esquelética de polissacarídeos. Os componentes do esqueleto da parede celular da maioria dos fungos patogênicos baseiam-se em uma estrutura de núcleo β -(1, 3)-glucano covalentemente ligado a β -(1, 6)-glucano e quitina (um polímero β -(1, 4) ligadas de N-acetilglicosamina (GlcNAc)). Estes polímeros formam ligações de hidrogênio entre as cadeias de polissacarídeos adjacentes para formar uma rede tridimensional dura de microfibrilas como pode ser visto na figura que se segue (Figura 04) (NETEA *et al.*, 2008).

A composição das paredes celulares é semelhante nos dois tipos morfológicos, na forma de levedura e filamentosa, no entanto, as quantidades de β -glucanos, quitina e mananas sofrem variações. Na forma filamentosa as células possuem pelo menos três vezes mais quitina do que as células na forma de levedura. Já no que se refere à quantidade de β -glucanos, a forma filamentosa possui mais ligações $\beta-1,3$, enquanto nas células na forma de levedura a razão de glucanos $\beta-1,6$ e $\beta-1,3$ é bem semelhante (CARDOSO, 2004).

Figura 04: Representação didática da parede celular de *C. albicans*. A figura mostra os principais componentes da parede celular e suas distribuições. $\beta-1,3$ – glucano e quitina (poli- $\beta-(1,4)-N$ -acetilglucosamina) são os principais componentes estruturais, estes estão localizados no interior da parede celular.



Fonte: NETEA *et al.*, 2008

Mudanças fenotípicas de espécies de *Candida* têm sido sugeridas como um importante fator de virulência que contribui para sua patogênese, além disso, proporciona maior variabilidade dentro das populações e adaptação aos desafios do ambiente. Tal mudança é acompanhada por mudanças na expressão de抗ígenos, morfologia da colônia, interações dentro do biofilme, capacidade de reprodução e afinidade ao tecido, tanto por *C. albicans* como outras espécies do gênero *Candida* (FRANÇA *et al.*, 2011).

A destruição dos tecidos do hospedeiro por espécies de *Candida* pode ser facilitada através da liberação de enzimas hidrolíticas, destas, as proteinases aspartil secretadas (SAPs), as fosfolipases, lipases e hemolisinas são frequentemente associadas à patogenicidade de *Candida*. SAPs facilitam tanto a invasão como a colonização dos tecidos do hospedeiro

através da ruptura das membranas, além de degradar importantes proteínas estruturais e também de defesa (SILVA *et al.*, 2012).

3.1 *Candida tropicalis*

C. tropicalis é uma levedura diplóide pertencente ao filo dos ascomicetos. Para os seres humaos é um patógeno oportunista capaz de colonizar locais distintos do corpo, incluindo a pele e o trato gastrointestinal e genito-urinário, além de estar presente nas vias respiratórias. Pode também ser recuperado do meio ambiente, especialmente de superfícies presentes em ambientes médicos (NEGRI *et al.*, 2012a).

Dentre os fungos que afetam a saúde humana *C. tropicalis* é a principal responsável por septicemia e candidíase disseminada, especialmente em pacientes com linfoma, leucemia e diabetes. Além disso, demonstra alta resistência a antifúngicos (MANDALA *et al.*, 2011). No Brasil, *C. tropicalis*, é uma das principais causas de candidemia e sua epidemiologia é semelhante a de *C. albicans* (FRANÇA *et al.*, 2011).

Normalmente, é considerada a primeira ou segunda espécie de CNA isolada com maior frequência de infecções fúngicas da corrente sanguínea (candidemia) e do trato urinário (candidúria). Além de ser encontrada em pacientes internados em UTIs, especialmente aqueles com câncer, pois exigem o uso de catéter por um período prolongado e/ou recebimento de antibióticos de amplo espectro. Aparentemente, esta possui maior potencial para se disseminar em hospedeiros neutropênicos do que *C. albicans* e outras espécies de CNA. Tal fato pode explicar os altos índices de mortalidade associados a infecções fúngicas causadas por *C. tropicalis* (NEGRI *et al.*, 2012a).

Espécies de *Candida* também estão presentes na cavidade oral humana, estas são capazes de crescer em diferentes condições ambientais, sendo *C. albicans* a mais frequente na cavidade oral de crianças e adultos. Podem ser encontradas na língua, bochechas, palato, mucosas, materiais de restauração e próteses dentárias. Bem como em cárie radicular e em sulcos gengivais infectados. Em pessoas saudáveis, *Candida* raramente provoca doenças. Sua conversão do comensalismo ao parasitismo é geralmente associada a mudanças no ambiente oral, como por exemplo, o uso de próteses sem adequada higienização, ou fatores sistêmicos como diabetes mellitus tipo 2 e imunodeficiência (VARGAS *et al.*, 2013).

Inúmeros fatores de virulência parecem ser responsáveis por infecções ocasionadas por *C. tropicalis*. Dentre estes, se destacam a sua capacidade para se aderir e formar biofilmes em diferentes dispositivos médicos de uso permanente, além de sua

capacidade para se aderir, invadir e danificar tecidos do hospedeiro humano, devido à produção de enzimas, como as proteases (NEGRI *et al.*, 2012a).

C. tropicalis produz leveduras ovais e pseudo-hifas (SILVA *et al.*, 2011). Fatores de virulência, tais como adesão a superfícies (células epiteliais e dispositivos médicos), formação de biofilme, secreção de enzimas (proteases e fosfolipases) e atividades hemolítica são importantes para o desenvolvimento de infecções causadas por esta levedura (NEGRI *et al.*, 2012b).

Esta levedura é capaz de se aderir a superfícies abióticas, células e tecidos humanos. As células de *Candida* possuem adesinas (proteínas especiais da parede celular), que permitem sua adesão a substratos específicos. Além disso, outros fatores, como as interações físico-químicas entre as células da levedura e a superfície a qual ela irá se aderir, bem como fatores ambientais, podem influenciar a adesão inicial de *C. tropicalis*. É importante ressaltar que a adesão das células de *Candida* a superfícies abióticas e outras células é essencial para a formação do biofilme (NEGRI *et al.*, 2012b).

Uma vez aderida às células do hospedeiro, *C. tropicalis* necessita de outros fatores para que possa penetrar nos tecidos mais profundos, como é o caso da formação de pseudo-hifas e a produção de enzimas. Assim como acontece em *C. albicans*, estudos *in vitro* revelaram que *C. tropicalis* produz níveis elevados de SAPs em meio contendo albumina de soro bovino. Além disso, *C. tropicalis*, possui pelo menos quatro genes que codificam SAPs, designados SAPT1 a SAPT4 (SILVA *et al.*, 2012).

Assim como outras espécies de CNA *C. tropicalis* demonstra habilidade para formação de biofilme, sendo que sua presença durante a infecção tem sido associada a maiores taxas de mortalidade quando comparadas com isolados incapazes de formar biofilmes. É possível que a formação de biofilmes e subsequente produção de matriz seja dependente da espécie, estirpe e condições ambientais como o pH, a composição do meio e a quantidade de oxigênio (SILVA *et al.*, 2011).

3.2 Adesão e formação do biofilme de *Candida*

O primeiro passo para infecções provocadas por *Candida* é sua aderência ao organismo e/ou a superfície de dispositivos médicos, muitas vezes levando à formação de biofilmes. Desta forma, a adesão se configura como um passo importante no processo de infecção, sendo que a extensão da adesão microbiana depende do hospedeiro e das

propriedades das superfícies bióticas, como a hidrofobicidade da superfície celular e da composição da parede celular (SILVA *et al.*, 2011).

O contato inicial entre os micro-organismos e as superfícies do hospedeiro é geralmente através da parede celular fúngica e, portanto, acredita-se que desempenham um papel fundamental na patogenicidade das espécies de *Candida*. Este é o local onde ocorrem as interações físico-químicas entre o micro-organismo e as superfícies do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2011). As principais proteínas da parede celular que medeiam a adesão entre *Candida* e células do hospedeiro ou material inerte são adesinas e manoproteínas que também são responsáveis pela formação e crescimento de biofilmes em órgãos e dispositivos médicos (CRUZ *et al.*, 2012).

Os biofilmes apresentam propriedades características arquitetônicas e fenotípicas distintas das células que vivem de forma planctônica. Talvez a propriedade clinicamente relevante do biofilme seja o desenvolvimento de resistência antimicrobiana que pode ser de até 1000 vezes maior do que as células planctônicas. Este modo de vida torna extremamente difícil, se não impossível, de ser controlado no ambiente médico (NETT *et al.*, 2007).

A fixação inicial de espécies de *Candida* ao hospedeiro e/ou dispositivos médicos é seguida por divisão celular, proliferação e posterior desenvolvimento do biofilme. Estes são comunidades formadas pela associação entre micro-organismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, incorporados em uma matriz extracelular, sendo considerada a forma mais prevalente de crescimento dos micro-organismos (SILVA *et al.*, 2011).

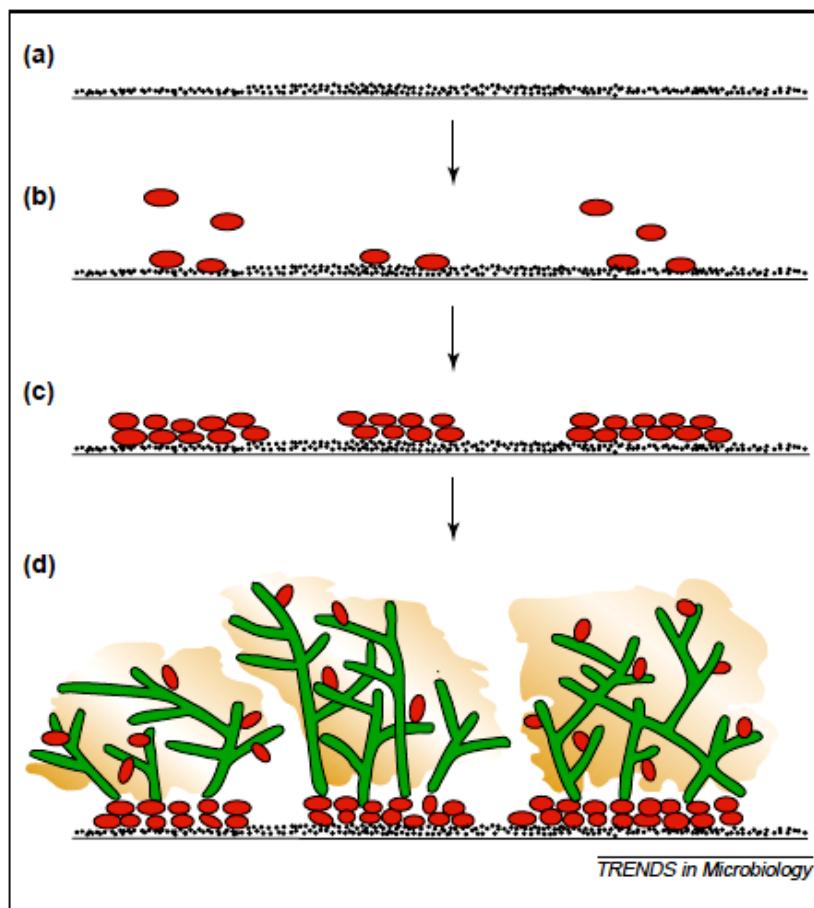
O desenvolvimento do biofilme de *Candida* é constituído por várias etapas. Este tem início com a adesão, seguida da divisão e proliferação das células de levedura (microcolônicas), início da transição da forma de levedura para hifa ou pseudo-hifa e secreção de substâncias poliméricas extracelulares (Figura 05). É possível que a resistência aos medicamentos apresentada por biofilmes de *Candida* esteja relacionada a mudanças nos polissacarídeos da parede celular e essas mudanças predominantemente dizem respeito à quantidade de β -1,3 glucana (CIRASOLA *et al.*, 2013).

Estes biofilmes, além da elevada carga microbiana associada, possuem alta resistência aos agentes antifúngicos, fazendo com que o seu tratamento e eliminação sejam muito difíceis (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012). Além disso, esse modo de vida permite que espécies de *Candida* gerenciem os nutrientes disponíveis no ambiente, se comuniquem através de moléculas químicas, e assim possam colonizar diferentes tecidos e dispositivos médicos do hospedeiro humano (CRUZ *et al.*, 2012). Entre os isolados clínicos de *Candida*, a formação de biofilme é variável e depende de cada espécie (VARGAS *et al.*, 2013). Estudos

recentes classificaram isolados clínicos de *C. tropicalis* como bons formadores de biofilme, estes consistem em um aglomerado de células e formas filamentosas (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012).

Nas últimas duas décadas, os biofilmes passaram a ser considerados como fatores de virulência muito importantes para o estabelecimento de candidíase, pois as células que apresentam este modo de vida proporcionam elevada resistência ao tratamento antifúngico e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Tem sido relatado que as estirpes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* que foram isoladas durante uma infecção fúngica, capazes de formar biofilmes, provoca altos níveis de mortalidade (25-50%), quando comparadas com isolados clínicos incapazes de formar biofilmes (CRUZ *et al.*, 2012).

Figura 05: Representação dos estágios de formação de um biofilme de *C. albicans* na superfície de um cateter. (a) superfície do cateter com um filme condicionado de proteínas adsorvidas do hospedeiro (pontos pretos); (b) aderência inicial das leveduras (em vermelho); (c) formação da camada basal de microcolônias de células de levedura; (d) biofilme maduro constituído por leveduras (em vermelho), hifas (em verde) e a matriz extracelular (em laranja), que circunda leveduras e hifas.



Fonte: DOUGLAS, 2003

A matriz do biofilme produzida por *C. tropicalis* é composta por carboidratos, proteínas, hexosaminas, fósforo e ácido urônico. Vale ressaltar que carboidratos e proteínas são produzidos em menor quantidade, enquanto hexosaminas (27%) é o principal componente da matriz (SILVA *et al.*, 2011). É importante ressaltar que essa composição, é dependente das condições ambientais, a composição do meio, o pH, a quantidade de oxigênio e as condições de crescimento (estático ou em fluxo) (NEGRI *et al.*, 2012b).

Uma vez que estas células estão no interior do biofilme necessitam se comunicar entre si, e para isso produzem e liberam moléculas que podem ser reconhecidas, como sinais, pelas células envolvidas. Este mecanismo é chamado de QS (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012). Estes sinais são produzidos em resposta ao aumento da população microbiana e tem o intuito de coordenar a ação das células. Em geral, podem regular algumas propriedades virulentas, morfológicas e fisiológicas importantes por meio da ativação dos genes apropriados. As duas principais moléculas QS mais estudadas em *Candida* são o farnesol e o tirosol (GREGUŠ *et al.*, 2010).

Farnesol foi à primeira molécula QS a ser descrita em *C.albicans*, esta mostrou capacidade para inibir a filamentação desta espécie bem como a formação de biofilme. No que se refere às espécies de CNA, o farnesol demonstrou-se capaz de retardar o crescimento celular, não tendo efeito significativo sobre a formação de biofilme. Já o tirosol provoca efeitos contrários ao farnesol, ou seja, aumenta a filamentação e formação de biofilme de *C. albicans* (HENRIQUE; NEGRI; SILVA, 2012).

Outro fator que merece atenção no ciclo de vida do biofilme está relacionado à dispersão/separação de células que se desprendem do biofilme e podem se estabelecer em outros locais, aumentando o risco de candidíase disseminada (NEGRI *et al.*, 2012b).

Capítulo 4 – Revisão de literatura

Interação entre fungos e bactérias

4 Interação entre fungos e bactérias

A maioria dos micro-organismos cresce sob a forma de biofilmes polimicrobianos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Raramente os encontramos vivendo sozinhos em sua forma planctônica. Biofilmes polimicrobianos podem ser definidos como um conjunto variado de organismos (fungos, bactérias e vírus) que estabelecem uma relação entre si e são revestidos por uma matriz, geralmente constituída por polissacarídeos (PETERS *et al.*, 2012).

A maior parte dos estudos a cerca das interações entre espécies dentro do biofilme têm-se centrado em espécies de bactérias. No entanto, há um aumento crescente no interesse em estudar as interações entre *Candida* e bactérias, estas podem variar de um simples antagonismo e parasitismo, a associações do tipo patogênicas. (EL-AZIZI; STARKS; KHARDOR, 2004; SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009).

A complexidade dos biofilmes polimicrobianos é comumente representada pelas populações microbianas existentes na cavidade oral. A colonização da superfície dos dentes e tecidos orais ocorre de forma temporal, de modo que a fixação de algumas espécies de micro-organismos torna-se suporte para que outras possam se aderir. Sendo assim, a composição dos primeiros colonizadores determina os micro-organismos que irão se aderir. Este processo de ligação sequencial é comumente referido como coagregação (PETERS *et al.*, 2012).

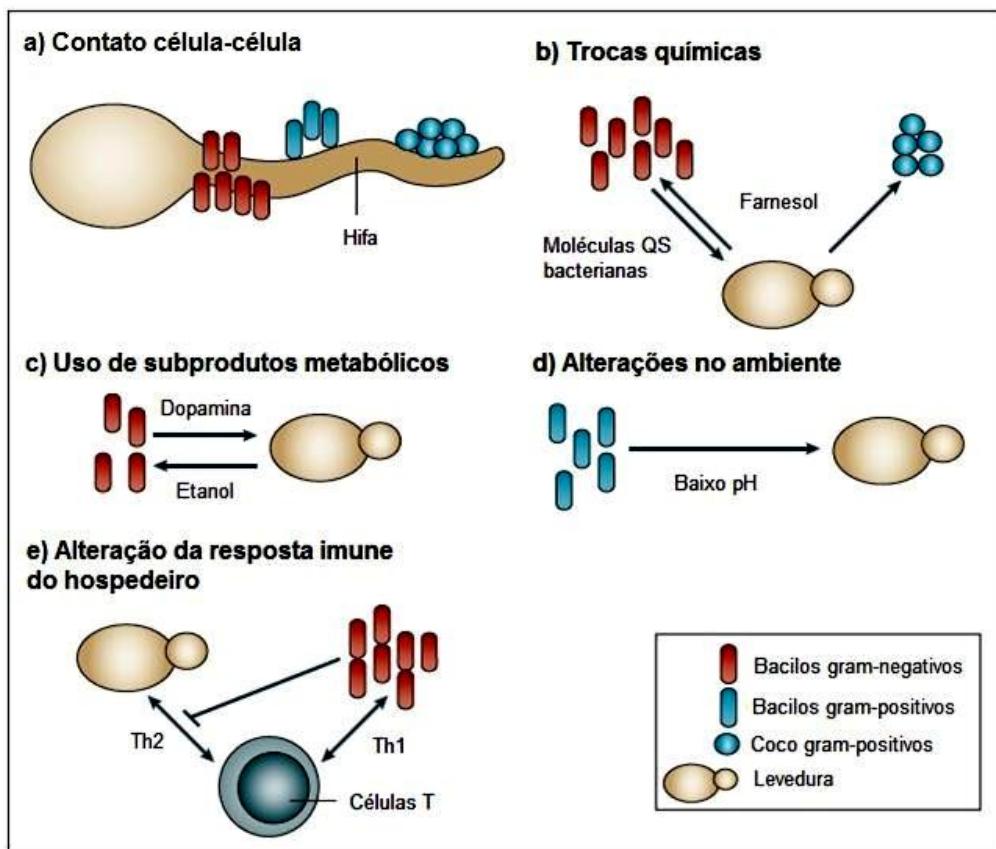
Um exemplo que mostra a complexidade envolvida na coagregação pode estar na gama de coagregações entre gêneros que ocorrem entre o fungo patogênico *C. albicans* e outras espécies orais, que podem desempenhar um importante papel na colonização da levedura a cavidade oral. Embora *S. gordonii*, *S. oralis* e *S. sanguinis* apresentem maior afinidade por *C. albicans*, a mesma e, também *C. dubliniensis*, demonstram-se capazes de se coagregar com espécies de *Fusobacterium* em suspensão (PETERS *et al.*, 2012).

As infecções ocasionadas por biofilmes polimicrobianos, onde haja a interação entre bactérias e fungos podem apresentar propriedades distintas das infecções ocasionadas por uma única espécie de micro-organismo. Estes são mais difíceis de tratar com antibióticos e antifúngicos. Esses biofilmes podem ser mais resistentes como resultado da composição de uma matriz mais complexa, e supõe-se que este tipo de infecção apresente perfis diferentes de resistência a antibióticos (WARGO; HOGAN, 2006).

Ao longo dos anos os micro-organismos desenvolveram complexos mecanismos para sua sobrevivência e defesa contra condições ambientais e nutricionais adversas, bem como contra a concorrência de outros micro-organismos (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS,

2010). Estes mecanismos entre fungos e bactérias são, sem dúvida, bastante diversificados, como pode ser visto na figura 06 (WARGO; HOGAN, 2006).

Figura 06: Representação didática das interações entre fungos e bactérias. a) Contato célula-célula. Estas incluem a aderência bacteriana a superfície fúngica ou coagregação de células fúngicas, a formação de biofilmes bacterianos na superfície das hifas fúngicas e a formação de biofilmes de espécies mistas sobre uma superfície biótica ou abiótica. b) Trocas químicas. Por exemplo, diversas bactérias produzem pequenas moléculas que afetam a morfologia de *C. albicans*. Assim, alteram a capacidade deste fungo para formar biofilme ou invadir tecidos. c) Uso de subprodutos metabólicos. d) Alterações no ambiente. e) Alteração da resposta imune do hospedeiro. *Quorum sensing* (QS) e células T auxiliares (Th).



Fonte: Adaptado de PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010.

Alguns micro-organismos evoluíram relações de mutualismo ou de sinergismo para facilitar a convivência nas superfícies as quais estão aderidos e utilizar eficazmente subprodutos metabólicos. Por outro lado, alguns micro-organismos têm desenvolvido relações antagonistas ou competitivas durante sua colonização. Essas interações são dependentes do contato e da comunicação célula-célula através de moléculas QS, o ambiente que irão colonizar, mudanças fenotípicas e consequentemente aumento da virulência e produção de imunomoduladores ou a combinação destes eventos (PETERS *et al.*, 2012).

Bactérias e fungos exercem influência, direta ou indiretamente, um sobre o outro. Fatores bacterianos podem influenciar o crescimento ou a fisiologia dos fungos, em

contrapartida, fatores fúngicos são capazes de controlar o comportamento e a sobrevivência das bactérias. A virulência, tanto de fungos como de bactérias, pode sofrer maiores influências dentro de um ambiente polimicrobiano (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

Diferentes interações entre bactérias e fungos já foram descritas, estas variam do contato e agregação da célula bacteriana às hifas fúngicas ou às células na forma de levedura. Tais interações podem estar associadas com a redução da viabilidade dos fungos, isso se deve a secreção, por parte das bactérias, de moléculas antifúngicas para o ambiente local, pela transferência de toxinas diretamente para dentro da célula fúngica através de sistemas de secreção ou por esgotamento de nutrientes. Outro mecanismo relacionado a este tipo de interação diz respeito à modificação do ambiente, como por exemplo, a alteração do pH, que pode influenciar a formação de hifas em *C. albicans* (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

C. albicans, como já referido anteriormente no capítulo 3, e outras espécies de *Candida* como *C. tropicalis*, são capazes de colonizar mucosas humanas. Muitas vezes formam biofilmes polimicrobianos através de sua associação com uma variedade de bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além de serem capazes de se ligarem a espécies de estreptococos orais. Estas associações podem melhorar a virulência, tanto de fungos como de bactérias, e em última análise, aumenta a gravidade da doença. Por exemplo, *C. albicans* amplia a formação do biofilme de *S. aureus* e também sua resistência à vancomicina (FALSETA; KOO, 2014).

Já no caso da interação *in vitro* entre *C. albicans* e *P. aeruginosa*, demonstrou-se que *P. aeruginosa* pode matar *C. albicans*, seja por meio da produção de toxinas, como a piocianina, ou por contato direto com as hifas da levedura (MÉAR *et al.*, 2013).

Estudos mais recentes levantam a hipótese de que é possível que a virulência de *C. albicans* seja aumentada, quando esta aparece em um quadro de infecção bacteriana. Verificou-se que o peptídeoglicano bacteriano conhecido muramil dipeptídeo atua como potente indutor do desenvolvimento de hifas em *C. albicans*. A formação de hifas é um importante determinante de virulência em infecções causadas por essa levedura. (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

O entendimento dos mecanismos que os micro-organismos usam dentro de um ambiente polimicrobiano não só aprofunda nosso conhecimento a respeito da patogênese microbiana, como também fornece novas e importantes ideias sobre vias passíveis para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

4.1 Interação entre estreptococos orais e *Candida*

Como já referido anteriormente, biofilmes mistos se desenvolvem através da coagregação e são importantes para o desenvolvimento da placa bacteriana e complicações posteriores. Estreptococos orais, em especial, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* dentre outros membros do grupo *Mitis*, se aderem bem a espécies de *Candida*, especialmente *C. albicans* (espécie mais estudada) (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010). Estas interações, entre leveduras e estreptococos, parecem essencialmente sinérgicas, onde além de proporcionar locais para adesão, os estreptococos excretam lactato que pode atuar como fonte de carbono para o crescimento da levedura. Por outro lado, *C. albicans* reduz a quantidade de oxigênio do ambiente, proporcionando condições ótimas para o desenvolvimento de estreptococos, além de produzir fatores de crescimento para estes micro-organismos como resultado do metabolismo de nutrientes (SHIRTLIFF *et al.*, 2009).

Tem sido demonstrado que a associação entre *C. albicans* e estreptococos orais na placa dental humana aparece formando estruturas que se assemelham a uma ‘espiga de milho’, onde os cocos aparecem em torno das hifas da levedura. Em biofilmes polimicrobianos os estreptococos podem atuar como ‘agentes patogênicos acessórios’ aumentando a virulência do biofilme, os quais estão inseridos (RICKER; VICKERMAN; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2014).

A variedade de interações entre gêneros que ocorre entre *C. albicans* e espécies orais possivelmente desempenha um importante papel na colonização da referida levedura a cavidade oral (SHIRTLIFF *et al.*, 2009). Com base em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, é provável que na interação entre *C. albicans* e estreptococos orais, os dois organismos formem uma associação entre os dois reinos (eucarionte e procarionte), que favorece a colonização ou a infecção da mucosa por *C. albicans*, especialmente em pacientes imunocomprometidos (RICKER; VICKERMAN; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2014).

Vários mecanismos de interação entre os estreptococos orais e *C. albicans* já foram identificados. Por exemplo, a adesão entre *S. gordonii* e *C. albicans* é mediada por duas proteínas. Uma destas proteínas apresenta atividade enzimática (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase – GPDH), e a outra tem função de agregar células (SSPA/B). Als3p, uma proteína da parede das hifas serve como um receptor para a adesina estreptocócica SSP/B. Já no caso da interação que ocorre entre *C. albicans* e *S. viridans*, a produção de ácidos

orgânicos contribuem para um ambiente com baixo pH, que pode favorecer o crescimento da forma de levedura (RICKER; VICKERMAN; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2014).

A compreensão dos complexos mecanismos da interação que envolve *Candida* e bactérias orais fornecerá subsídios para o desenvolvimento de novos protocolos que busquem impedir e/ou eliminar infecções orais relacionadas a esse tipo de interação. Além disso, a compreensão das bases moleculares resultantes dessa interação irá auxiliar no futuro, o desenvolvimento de formas mais poderosas e eficazes de combater a resistência a antifúngico (SHIRTLIFF *et al.*, 2009).

4.2 Estratégias biotecnológicas de uso de subprodutos bacterianos para inibição da formação e desenvolvimento de biofilmes

A natureza oferece um reservatório enorme de organismos capazes de produzir compostos potencialmente benéficos, que ainda precisam ser descobertos e explorados (bioprospecção). A capacidade da natureza em produzir compostos moleculares variados (quimiodiversidade) é incomparável (BERTRAND *et al.*, 2014).

Fungos e bactérias possuem um grande potencial para produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários que podem ser utilizados em diversas aplicações, inclusive na área da saúde (CARVALHO; ABRAHAN; MACEDO, 2008). Embora pouco se saiba a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na interação entre estes organismos e seu impacto para a saúde, a história tem demonstrado a importância dessas interações, como é o caso da descoberta acidental da penicilina (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010), que ocorreu em consequência de uma contaminação (cocultura) de *Staphylococcus spp.* com *Penicillium sp.*, em 1929 por Alexander Fleming. Pesquisas recentes indicam que a interação entre estes micro-organismos é, entre outros fatores, mediada pela expressão de pequenas moléculas (BERTRAND *et al.*, 2014).

Metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular e que não são utilizados para o crescimento do organismo, neste caso, especificamente, os micro-organismos. Esses metabólitos são caracterizados pela diversidade de estruturas químicas e variação de sua forma em diferentes condições ambientais, conferindo vantagens ao organismo produtor. Acredita-se que a produção desses metabólitos pelos micro-organismos está relacionada à sua comunicação e proteção no ambiente, proporcionando sua sobrevivência em condições de estresse (CARVALHO; ABRAHAN; MACEDO, 2008).

A produção de metabólitos secundários nas espécies vivas depende do crescimento ou de condições de cultura, o que pode ser difícil de controlar. Além disso, os extratos contendo os produtos naturais são misturas complexas com a presença de compostos tóxicos que podem mascarar os efeitos dos constituintes ativos, que normalmente aparecem em pequenas quantidades, dificultando sua identificação (BERTRAND *et al.*, 2014).

Entre as fontes de produtos naturais, os micro-organismos se mostram promissores candidatos à produção de novos compostos e drogas a serem utilizadas na clínica. Exemplos bem conhecidos são fornecidos pela β -lactana e a penicila. Além destes, outros compostos importantes isolados a partir de micro-organismos incluem os macrólidos, utilizados como antibióticos (Eritromicina), antifúngicos (Anfotericina B), imunossupressores (Ciclosporina) e depsipeptídeos com atividade antibiótica (BERTRAND *et al.*, 2014).

Algumas moléculas isoladas de micro-organismos são usadas como bioativos, como por exemplo, os ramanolipídeos (sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa*), surfatinas de *Bacillus subtilis* e emulsanos de *Acinetobacter calcoacetus*. Muitas delas, além das propriedades surfactantes, também exibem atividades antimicrobianas e antiadesivas. Nesse caso, verificou-se que a adesão de *S. salivarius*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. tropicalis* a silicone pré-condicionado com ramanolipídeos foi inferior à observada em silicone não tratado e a perfusão do bioativo nas células aderidas conduziu ao seu desprendimento (SOUZA; COELHO; PEREIRA, 2012).

Como se pode ver, os bioativos, derivados de organismos vivos, principalmente de micro-organismos têm atraído a atenção dos pesquisadores pelo fato de apresentarem características vantajosas, como a diversidade estrutural, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental e menor concentração crítica de micelas (CMC) (RUFINO *et al.*, 2011).

Tais propriedades são relevantes e levam os bioativos a várias aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e, especialmente na área médica, afetando a dinâmica de desenvolvimento da população microbiana, regulando sua adesão as superfícies, e controle do biofilme (SOUZA; COELHO; PEREIRA, 2012). Entretanto, a natureza e funções de bioativos potencialmente produzidos em biofilmes polimicrobianos ainda são pouco conhecidas (RENDUELES *et al.*, 2011).

Comparado a outros recursos naturais, os micro-organismos são atualmente a fonte mais atraente para descoberta de compostos biologicamente ativos, especialmente por serem ubíquos e apresentarem uma imensa biodiversidade e grande quimiodiversidade que pode ser encontrada dentro de uma determinada espécie (BERTRAND *et al.*, 2014).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar, *in vitro*, os efeitos da interação entre as bactérias *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* e a levedura *Candida tropicalis*.

5.2 Objetivos Específicos

- Analisar a influência dos metabólitos extracelulares produzidos por *C. tropicalis* sobre o crescimento dos biofilmes das bactérias *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*;
- Verificar a influência dos metabólitos extracelulares produzidos pelas bactérias *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* sobre o crescimento de *C. tropicalis* na sua forma planctônica e de biofilme;
- Avaliar os efeitos dos metabólitos extracelulares produzidos por *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* sobre a capacidade de filamentação de *C. tropicalis*.

Capítulo 6 – Materiais e Métodos

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cepas utilizadas

As cepas utilizadas neste estudo foram as espécies bacterianas *Streptococcus oralis* ATCC10557, *Streptococcus sanguinis* ATCC10556, *Streptococcus parasanguinis* ATCC903 e a levedura *Candida tropicalis* ATCC750, disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ Rio de Janeiro-Brasil. Todas as cepas foram mantidas em meio de cultura suplementado com 20% de glicerol e armazenadas no ultrafreezer a uma temperatura de -80°C até a utilização experimental.

6.2 Cultivo dos micro-organismos

Partindo de uma cultura estoque, uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana foi inoculada em tubos contendo 5 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI; M210-500G, HIMEDIA) estéril e incubada por 24 horas, com 10% de CO₂ a 37°C. Após a ativação inicial, a cultura foi renovada em 5 mL de meio BHI caldo estéril adicionando 50 µL do inóculo e cultivada por 16 horas com 10% de CO₂ a 37°C. A levedura *C. tropicalis* foi cultivada em meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB; M033-500G, HIMEDIA) em ambiente aeróbico a 37°C por 14 horas. Para os ensaios microbiológicos tanto as bactérias como a levedura foram centrifugadas em uma micro centrífuga refrigerada (VS-15000CFNII, VISION) a 5000 X g por 5 min e o *pellet* ressuspandido para o ajuste adequado da concentração celular, 5 x 10⁷ UFC/mL e 3 X 10⁶ UFC/mL, respectivamente.

6.3 Preparação da saliva

Saliva não estimulada foi coletada de cerca de 10 voluntários saudáveis pelo menos uma hora após a higienização oral. A saliva dos doadores foi agrupada e à mistura foi adicionado ditiotreitol (DTT 2,5 mM), um antioxidante capaz de manter as propriedades biológicas das proteínas e enzimas presentes na saliva. A clarificação da saliva foi obtida por centrifugação (10. 000 X g, 10 min.) e o sobrenadante foi diluído a 25% em água destilada e esterilizada por filtração em membrana de nitrocelulose 0,22 µM à vácuo. A saliva resultante foi aliquotada e armazenadas a -20°C (SILVERMAN *et al.*, 2010). A saliva usada neste

ensaio tem o objetivo de simular a película adquirida do esmalte (PAE) nas placas de poliestireno.

6.4 Preparação de sobrenadantes livres de células

Sobrenadantes (contento metabólitos extracelulares) na fase log foram preparados a partir de culturas de *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. parasanguinis* e *C. tropicalis*. Para coleta dos sobrenadantes células dos estreptococos supracitados foram cultivadas separadamente por 16 horas e a levedura *C. tropicalis* foi cultivada por 14 horas, como descrito anteriormente. Após esse período as culturas celulares foram centrifugadas em uma microcentrífuga refrigerada (VS-15000CFNII, VISION) a 5000 X g por 5 min a 4°C e filtradas em filtro milipore 0,22µm. A esterilidade das culturas foi verificada por meio de inóculo em meio BHI (estreptococos), e meio SDB (levedura) incubados por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes contendo os metabólitos extracelulares produzidos pelos micro-organismos supracitados, foram divididos em alíquotas e congelados a -20°C até sua utilização. Metodologia adaptada de Rendueles *et al.*, 2011.

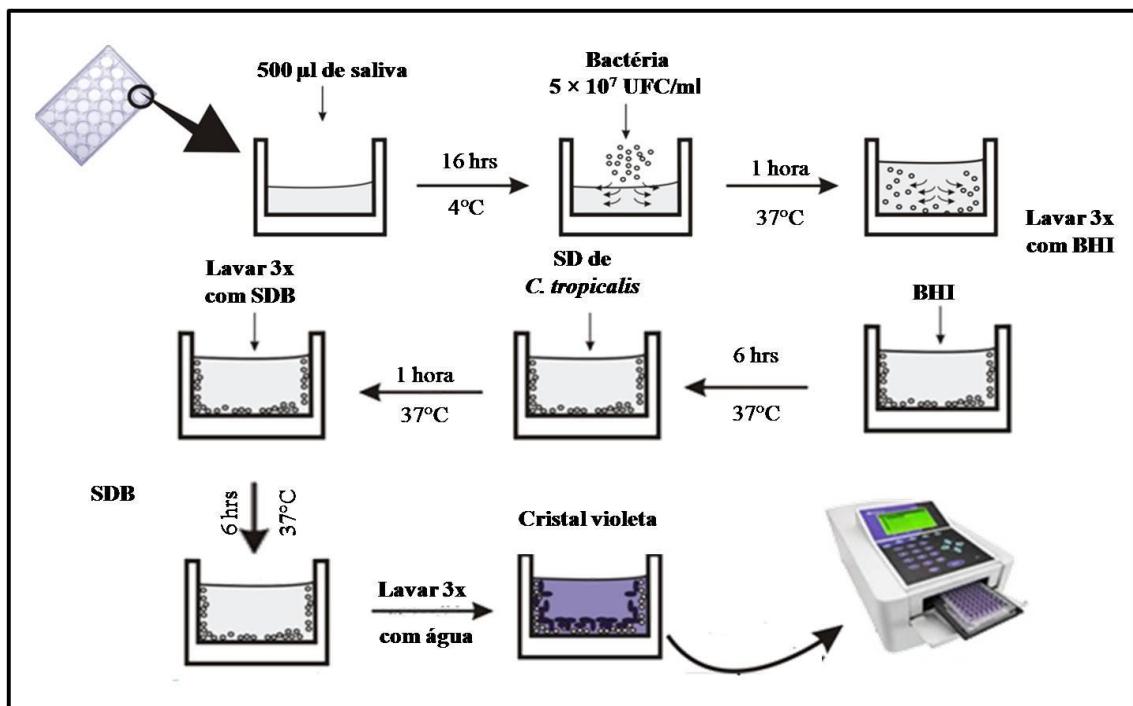
6.5 Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *C. tropicalis* (SCT) no biofilme pré-formado de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*

Saliva a 25% estéril (0,5mL) foi incubada em placas de poliestireno de 24 poços por 16 horas a 4°C para a formação da PAE e em seguida lavadas duas vezes com água destilada estéril (apenas nos poços onde os estreptococos foram inoculados). Então, 0,5 mL de cada micro-organismo devidamente ajustados foram divididos da seguinte maneira: na primeira linha (A) foi adicionado *S. oralis*, na segunda (B) *S. sanguinis*, na terceira (C) *S. parasanguinis*, e na quarta (D) controle (saliva + meio BHI). Em uma segunda placa, organizada da mesma forma, verificou-se o efeito dos metabólitos extracelulares de *C. tropicalis* (SCT) sobre os biofilmes dos estreptococos. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e depois o meio de cultura foi trocado a fim de retirar o excesso de células não aderidas e possibilitar o desenvolvimento do biofilme por mais 6 horas em estufa a 10% de CO₂ a 37°C.

Após 6 horas de incubação os poços foram novamente lavados com meio de cultura SDB. Na segunda placa, 0,5mL do sobrenadante de *C. tropicalis*, previamente preparado, foi adicionado aos poços contendo os estreptococos, e na primeira placa foi

adicionado apenas 0,5mL de meio SDB estéril. As placas foram incubadas em estufa a 10% de CO₂, a 37°C por 1 hora. Após esse tempo de contato os poços foram lavados duas vezes com meio SDB e então as placas foram levadas novamente para a estufa para o desenvolvimento do biofilme em contato com o sobrenadante por mais 6 horas (Figura 07). Essa metodologia foi adaptada de Silverman *et al.*, 2010.

Figura 07 – Desenho esquemático do planejamento experimental para verificar o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *C. tropicalis* (SCT) sobre o biofilme pré-formado de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*.



Fonte: Próprio autor.

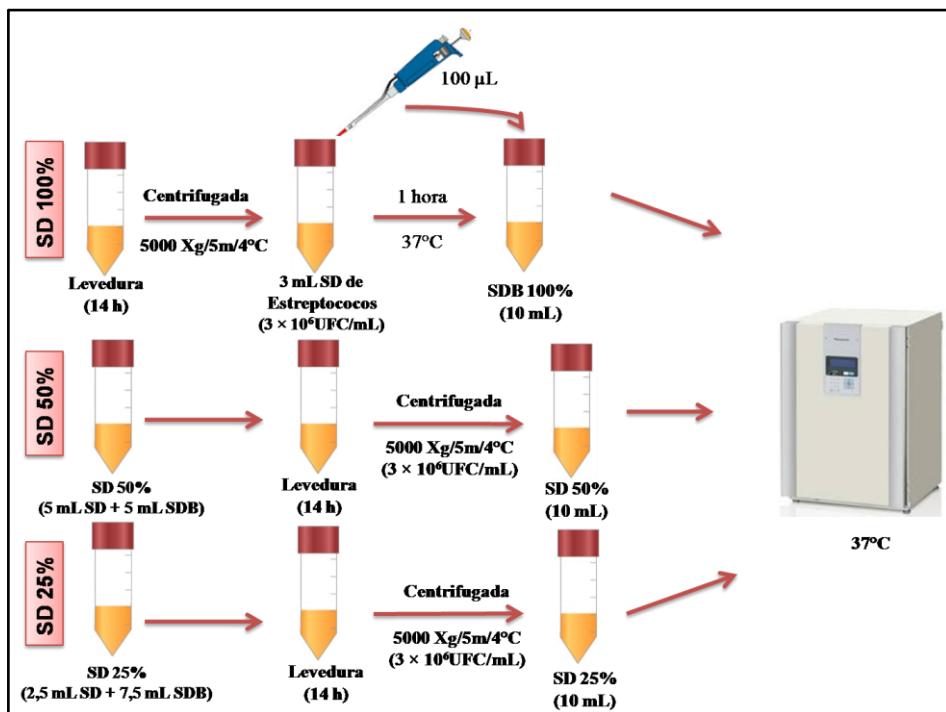
6.6 Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *S. oralis* (SSO), *S. sanguinis* (SSS) e *S. parasanguinis* (SSP) no crescimento planctônico e biofilme de *C. tropicalis*

6.6.1 Preparo dos sobrenadantes 100, 50 e 25%

Após 14 horas de crescimento a levedura foi centrifugada em uma microcentrífuga refrigerada (VS-15000CFNII, VISION) por 5 min a 5000 Xg a 4°C e o pellet ressuspêndido em três diferentes concentrações de sobrenadante de estreptococos: 25, 50 e 100%. Para o sobrenadante mais concentrado, o pellet de levedura foi simplesmente ressuspêndido em 3 mL de cada um dos sobrenadantes dos estreptococos (SSO, SSS e SSP)

com tempo de contato de 1 (uma hora) e em seguida 100 μ L de cada suspensão foi inoculado em 10 mL de meio de cultura. Para os ensaios com sobrenadante 50% o *pellet* de levedura foi ressuspensionado em 10 mL, sendo 5 mL de sobrenadante com 5 mL de SDB. Por último, 25%, o *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL, sendo 2,5 mL do sobrenadante dos estreptococos diluídos em 7,5 mL de meio SDB. Em todos os casos a concentração celular final foi ajustada para 3×10^6 UFC/mL (Figura 08). Os controles foram feitos nas mesmas concentrações utilizando somente meio SDB novo.

Figura 08 – Desenho esquemático do preparo dos sobrenadantes 100, 50 e 25%.



Fonte: Próprio autor.

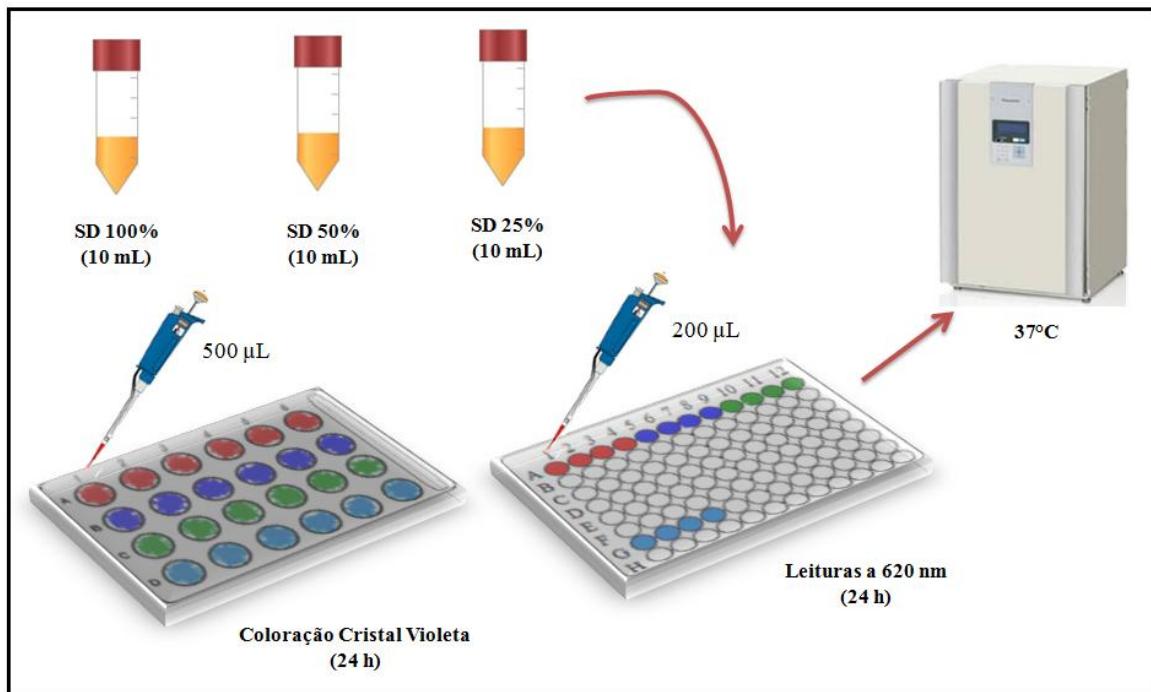
6.6.2 Quantificação do efeito dos metabólitos extracelulares

Os tubos contendo as culturas, descritas no item anterior, foram deixados em ambiente aeróbico a 37°C por 24 horas. Durante esse tempo eram retirados 200 μ L para uma nova placa de 96 poços (n=04) para o acompanhamento do crescimento planctônico da levedura. Os valores de absorbância de cada poço foi realizada com o auxílio do leitor de microplacas (BioTrak II, Amersham Biosciences) a 620 nm.

Ao mesmo tempo em uma segunda placa de 24 poços foram inoculados 0,5 mL de cada uma das suspensões para análise da formação do biofilme. Após 24 horas em ambiente aeróbico a 37°C foi feita a quantificação da biomassa do biofilme pelo método de coloração

por cristal violeta (descrito adiante). A suspensão obtida foi transferida para outra placa de 96 poços. A medida da absorbância de cada poço foi realizada com o auxílio do leitor de microplacas (BioTrak II, Amersham Biosciences) à 590nm (Figura09).

Figura 09 – Desenho esquemático do planejamento experimental para quantificar o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de SSO, SSS e SSP sobre o crescimento planctônico de *C. tropicalis* e biofilme 24 horas.



Fonte: Próprio autor.

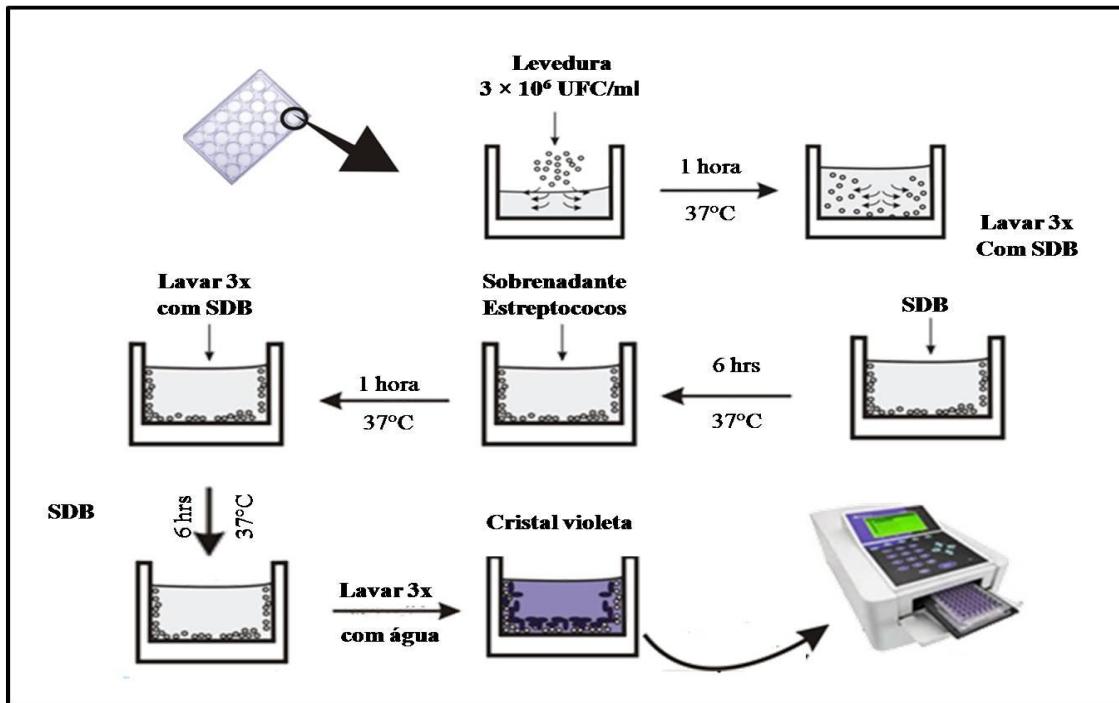
6.7 Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *S. oralis* (SSO), *S. sanguinis* (SSS) e *S. parasanguinis* (SSP) no biofilme pré-formado de *C. tropicalis*

Em uma placa de poliestireno de 24 poços foram adicionados 0,5mL de *C. tropicalis* em meio de cultura durante 1 hora em ambiente aeróbico a 37°C. Após incubação, o meio de cultura foi trocado a fim de retirar o excesso de células não aderidas e possibilitar o desenvolvimento do biofilme durante 6 horas nas mesmas condições.

No fim das 6 horas de incubação, os poços foram lavados com meio SDB para retirada do excesso de células não aderidas. Em seguida 0,5mL de cada um dos sobrenadantes dos estreptococos foram inoculados nos poços contendo *C. tropicalis*, da seguinte maneira: na primeira linha (A) *C. tropicalis* com SSO, na segunda (B) *C. tropicalis* com SSS, na terceira (C) *C. tropicalis* com SSP, e na quarta (D) *C. tropicalis*, utilizada como controle. A placa foi incubada por mais 1 hora e em seguida, os poços foram lavados duas vezes com meio SDB estéril e incubada novamente em estufa em ambiente aeróbico a 37°C por mais 6 horas. Então

foi feita a quantificação da biomassa do biofilme através do método de coloração por cristal violeta (Figura 10). Essa metodologia foi adaptada de Silverman *et al.*, 2010.

Figura 10 – Desenho esquemático do planejamento experimental para verificar o efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de SSO, SSS e SSP sobre o biofilme pré-formado de *C. tropicalis*.



Fonte: Próprio autor.

6.8 Quantificação da biomassa

Antes de iniciar o procedimento de coloração com cristal violeta todas as placas que fossem submetidas a esse procedimento eram lavadas três vezes com água destilada estéril. O procedimento, resumidamente, constitui-se de algumas etapas. Primeiro adiciona-se 0,5mL de álcool metílico P.A. para fixação das células aderidas por 15 minutos. Após a remoção do metanol, são adicionados 0,5mL de cristal violeta 0,1% por 15 minutos. Esse processo é realizado para permitir a quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração da parede celular do micro-organismo com cristal violeta. Após duas lavagens com água destilada, a placa será colocada em temperatura ambiente até secar completamente. Para a dissolução do corante preso ao biofilme, adiciona-se 0,5mL de ácido acético 33% por mais 15 minutos. A suspensão obtida é transferida para uma placa de 96 poços estéril e medida a absorbância de cada poço com o auxílio de um leitor de microplacas (BioTrak II, Amersham Biosciences) à 590nm. Para coloração dos biofilmes cultivados por 24 horas, foi utilizada a mesma metodologia para quantificação da biomassa.

6.9 Microscopia óptica

A análise de imagens do efeito dos sobrenadantes dos estreptococos sobre o biofilme de *Candida* foi realizada com auxílio de microscópio comum de bancada. O biofilme foi formado em placa de poliestireno como descrito nos item 6.6.1. Porém, previamente foi inserida uma lamínula circular de vidro, com 13 mm de diâmetro e 0,13-0,16mm de espessura (VIDROBRAS), em cada poço da placa para possibilitar a visualização microscópica. Após a formação dos biofilmes e a coloração dos mesmos com coloração cristal violeta, como descrito no item 6.8, as lamínulas contendo a biomassa formada foram retiradas com o auxílio de uma pinça e firmemente aderidas em lâminas fazendo uso da solução Bálsamo do Canadá e visualizadas em microscópio óptico comum. Essa metodologia foi usada segundo Michalany, 1998.

6.10 Análise estatística dos ensaios microbiológicos

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posteriormente analisadas no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA). As diferenças significativas entre os grupos foram verificadas através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p<0,01$.

Capítulo 7 – Resultados e Discussão

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

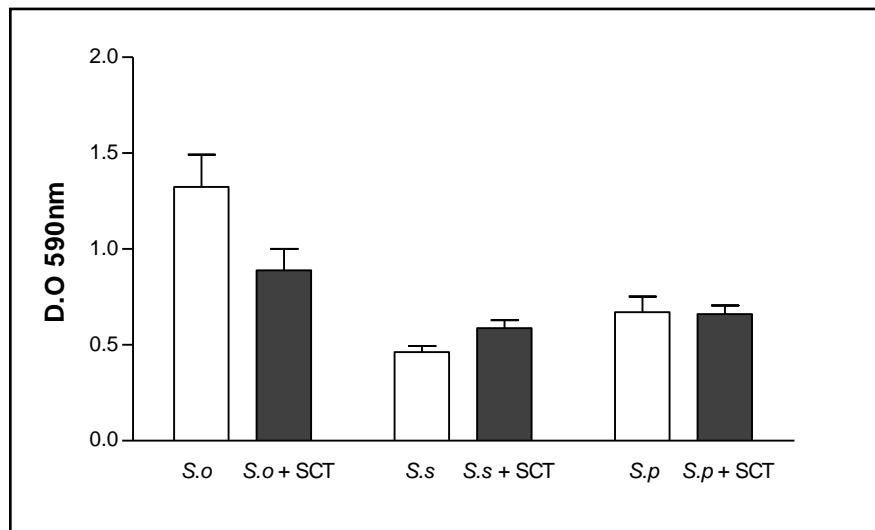
Os biofilmes constituem um reservatório de moléculas que podem desempenhar importante papel na dinâmica das interações entre patógenos e comensais dentro das comunidades bacterianas mistas. Um estudo mais aprofundado sobre a interação entre micro-organismos dentro dos biofilmes poderiam levar a uma melhor compreensão da biologia do biofilme, mas também descobrir novas moléculas de interferência de potencial interesse biomédico (RENDUELES *et al.*, 2011).

Neste estudo analisamos a influência de metabólitos extracelulares das bactérias orais *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* e a levedura *C. tropicalis* durante o crescimento dos mesmos. Para tanto, se utilizou o sobrenadante dos referidos micro-organismos nos quais estão presentes substâncias produzidas por eles e que podem exercer influência sobre o crescimento planctônico, formação de biofilme e mudanças na morfologia de outros micro-organismos. Os testes foram realizados em placas de poliestireno de 24 (formação dos biofilmes) e 96 (crescimento planctônico) poços. Saliva foi utilizada nos testes de formação dos biofilmes dos estreptococos, com o objetivo de simular a PAE da cavidade oral.

7.1 Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *C. tropicalis* (SCT) no biofilme pré-formado de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*

Para determinar o efeito de SCT sobre o crescimento do biofilme de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* foi utilizado o método de coloração cristal violeta (CV) que permite a quantificação indireta da formação de biofilme. Assim, nossos resultados mostram que SCT não interfere de forma significativa no aumento da biomassa dos biofilmes pré-formados de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*, quando comparados aos biofilmes não tratados com SCT. Na Figura 11 encontra-se o gráfico dos biofilmes formados por *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* e os biofilmes formados pelos referidos estreptococos em contato com SCT. Apesar de haver alguma diferença visual, nenhum dos resultados foram estatisticamente significantes.

Figura 11 – Avaliação do efeito do SCT sobre o desenvolvimento do biofilme de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*.



Fonte: Próprio autor. Formação do biofilme dos estreptococos (□) e estreptococos + SCT (■). Biofilmes formados por 17 horas. Diferença estatística não significativa, n=6.

Embora exista uma tendência em se estudar os compostos presentes no sobrenadante de SCT que influenciam o comportamento das bactérias, a presença da própria célula também possui sua importância. Por exemplo, El-Azizi, Starks e Khardor (2004) verificaram a interação entre *C. albicans* e outras espécies de CNA com certas bactérias em biofilmes e concluíram que a adição de *Candida spp.* em biofilmes pré-formados de bactérias diminui significativamente o número de células fúngicas dentro do biofilme. Os autores utilizaram as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* como cepas produtoras e não produtoras de glicocálice, além de *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*.

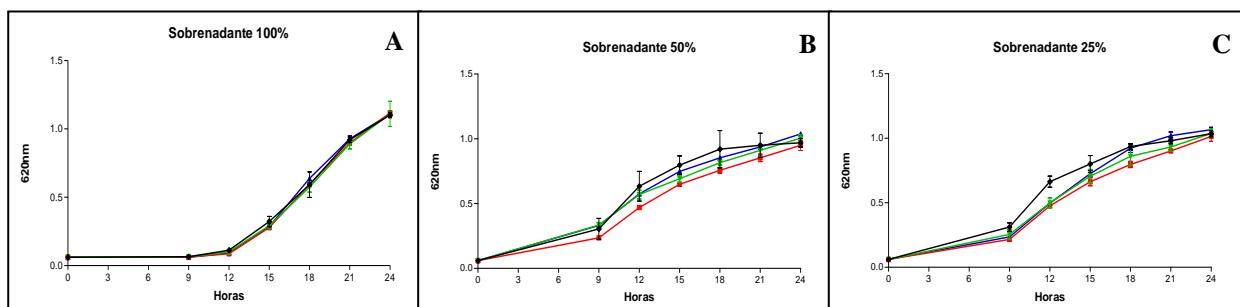
Os resultados apresentados pelos referidos autores mostraram que, com exceção de *P. aeruginosa* produtora de glicocálice, os biofilmes bacterianos reduziram significativamente a adesão e desenvolvimento de *C. albicans*. Entretanto, diferentes respostas foram observadas após a adição de *P. aeruginosa* ou *S. epidermidis* no biofilme pré-formado de *C. albicans*. O fungo proporcionou o aumento significativo da aderência e formação dos biofilmes da cepa não produtora de glicocálice, o mesmo não foi observado em isolados produtores de glicocálice. Bactérias não produtoras de glicocálice apresentam menor capacidade de aderência, por isso, a agregação das células de *C. albicans* reforça a sua adesão.

7.2 Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *S. oralis* (SSO), *S. sanguinis* (SSS) e *S. parasanguinis* (SSP) no crescimento planctônico e biofilme de *C. tropicalis*

Na segunda parte deste estudo, foi avaliado o efeito do sobrenadante de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* sobre o crescimento planctônico e a formação do biofilme de *C. tropicalis*. Para tanto foram utilizados dois métodos: o método turbidimétrico e a coloração cristal violeta (CV). O primeiro baseia-se na leitura da densidade óptica (OD) das suspensões celulares e o segundo permite a quantificação indireta da formação de biofilme através da coloração com cristal violeta.

Nos gráficos da figura 12 são apresentadas as curvas de crescimento planctônico de *C. tropicalis* sob influência de diferentes concentrações de sobrenadante dos estreptococos, SSO, SSS e SSP. Podemos observar que os mesmos não exercem influência estatisticamente significativa sobre o crescimento planctônico da levedura. No entanto, quando comparamos os resultados referentes a 50 e 25%, podemos observar que há uma tendência de redução no crescimento da levedura, especialmente quando em contato com SSO, entretanto sem diferenças estatísticas.

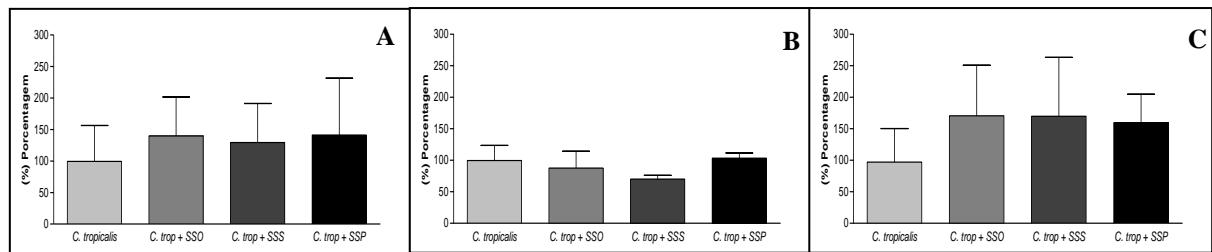
Figura 12 – Avaliação do crescimento planctônico de *C. tropicalis* quando em contato com SSO, SSS e SSP em diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor. Curva de crescimento planctônico de *Candida tropicalis* (→) e *C. tropicalis* + SSO (■), SSS (▲) e SSP (▲) 100% (A), 50% (B) e 25% (C) determinada pelo método turbidimétrico (OD 620nm). Crescimento acompanhado por 24 horas, obedecendo aos tempos 0, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas, n=8.

O mesmo acontece durante o desenvolvimento do biofilme. Os SSO, SSS e SSP não tiveram efeito estatisticamente significante sobre o aumento da biomassa do biofilme de *C. tropicalis* (Figuras 13). No entanto, ao se observar as figuras 14, 15 e 16, que se referem à microscopia óptica comum, podemos verificar claramente que o sobrenadante de todas as bactérias testadas SSO, SSS e SSP induzem a formação de hifas de *C. tropicalis*, a forma mais invasiva da referida levedura, especialmente SSS e SSP.

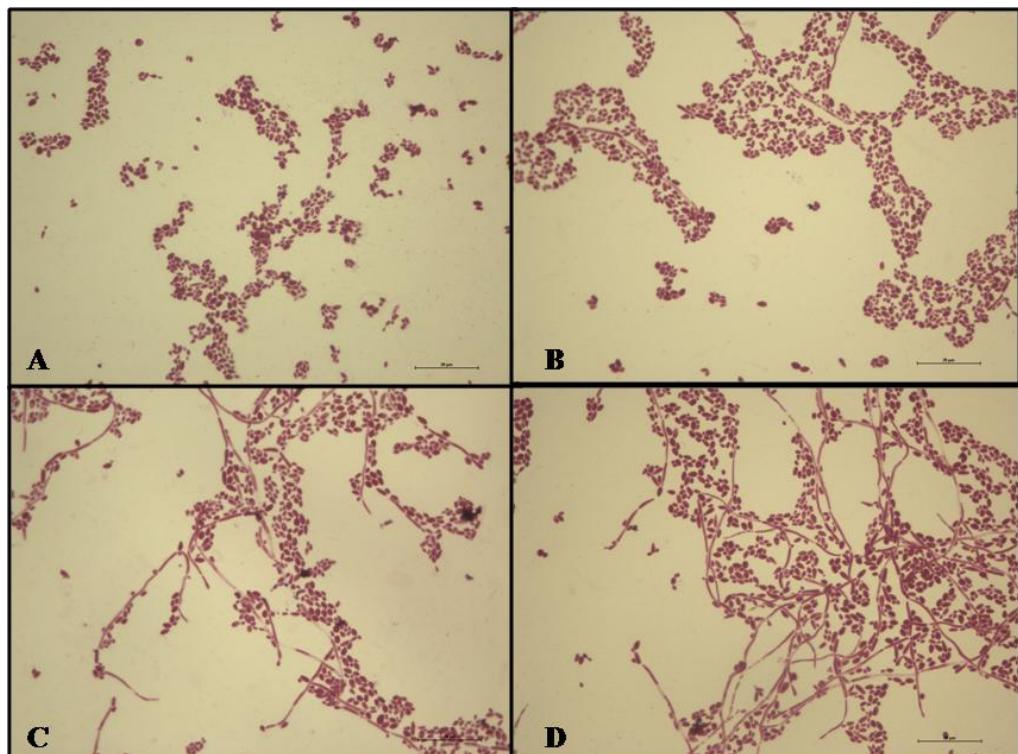
Figura 13 – Avaliação da formação do biofilme de *C. tropicalis* quando em contato com SSO, SSS e SSP em diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor. Formação do biofilme de *C. tropicalis* (■), *C. tropicalis* + SSO (■), SSS (■), e SSP (■). 100% (A), 50% (B) e 25% (C). Biofilmes formados por 24 horas. Diferença estatística não significativa, n=9 (A), n=6 (B) e n=8 (C).

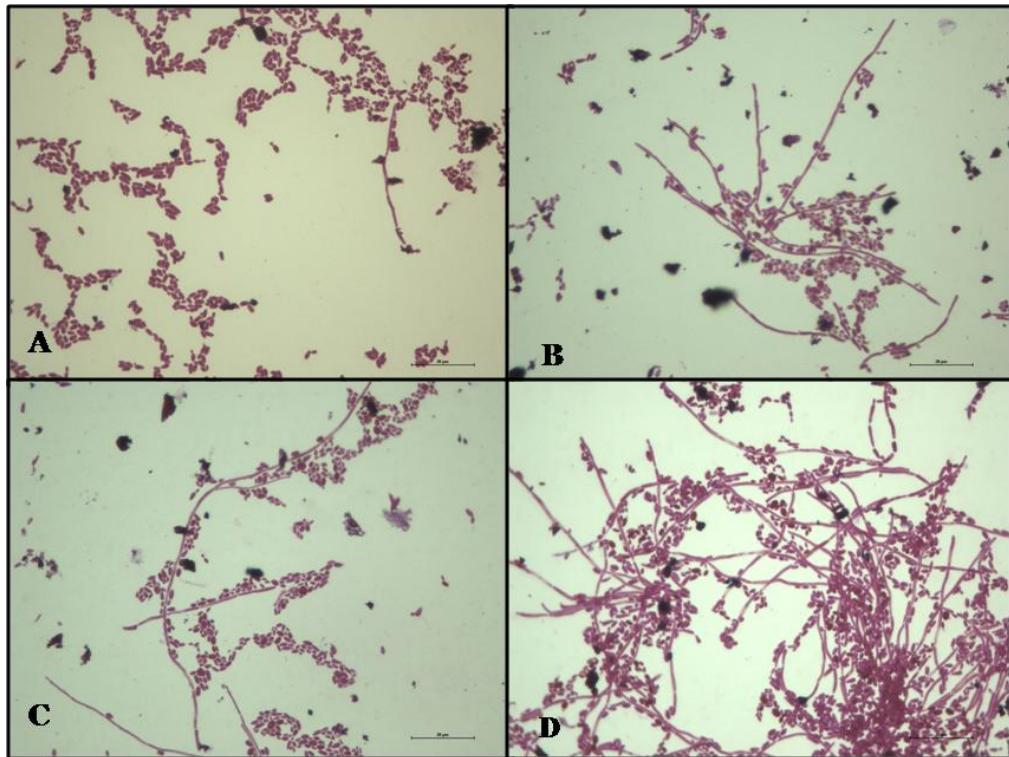
Uma forma pela qual os micro-organismos podem interagir e aumentar a patogenicidade de outros micro-organismos é através da modulação da resposta do hospedeiro. Em trabalho realizado por Xu *et al.* (2014) uma bactéria que habita a cavidade oral de seres humanos saudáveis pode estabelecer relações de sinergismo com *C. albicans* e aumentar a gravidade de lesões na mucosa bucal. Este é o primeiro relato da capacidade de sinergismo de *C. albicans* com espécies estreptocócicas, que são considerados membros não virulentos da microflora de seres humanos em modelos de rato *in vivo*.

Figura 14 – Imagens de microscopia óptica comum (aumento de 40X). Biofilmes formados por 24 h. (A) *C. tropicalis*; (B) *C. tropicalis* + SSO; (C) *C. tropicalis* + SSS; (D) *C. tropicalis* + SSP. Sobrenadante 100%



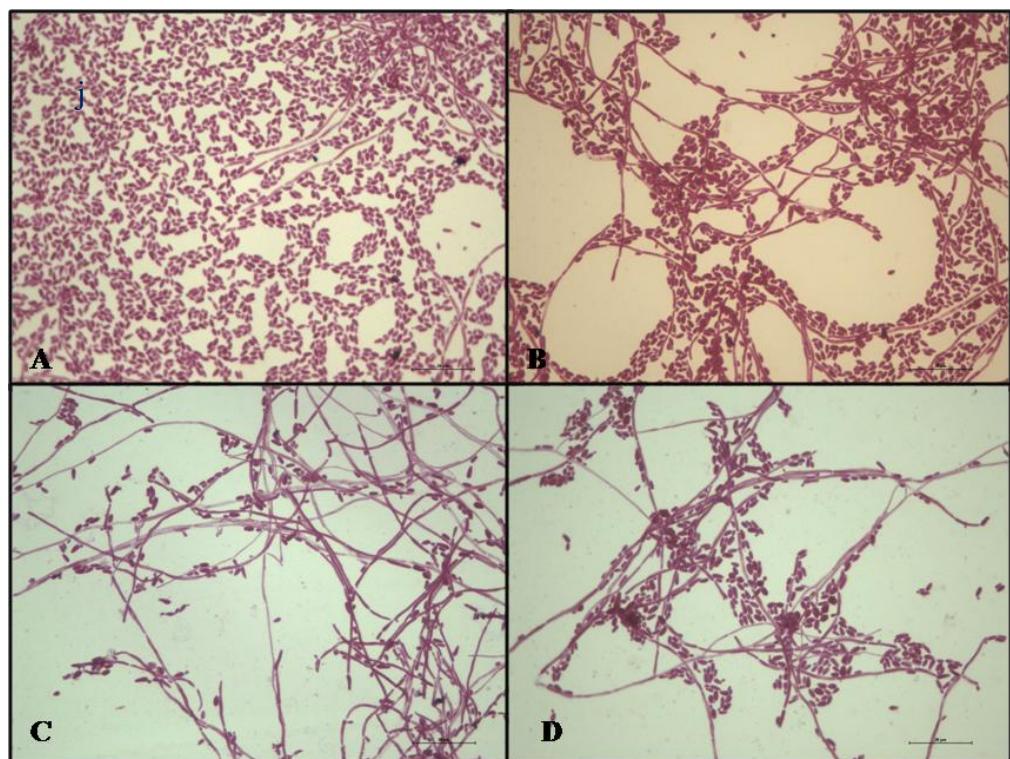
Fonte: Próprio autor

Figura 15 – Imagens de microscopia óptica comum (aumento de 40X). Biofilmes formados por 24 h. (A) *C. tropicalis*; (B) *C. tropicalis* + SSO; (C) *C. tropicalis* + SSS; (D) *C. tropicalis* + SSP. Sobrenadante 50%.



Fonte: Próprio autor

Figura 16 – Imagens de microscopia óptica comum (aumento de 40X). Biofilmes formados por 24 h. (A) *C. tropicalis*; (B) *C. tropicalis* + SSO; (C) *C. tropicalis* + SSS; (D) *C. tropicalis* + SSP. Sobrenadante 25%.



Fonte: Próprio autor

Interações entre candidas e bactérias presentes nas mucosas de seres humanos podem ser sinérgicas ou antagônicas, isso dependerá da espécie bacteriana, o local onde está localizada e das condições do ambiente (XU *et al.*, 2014). Por exemplo, um estudo realizado por Ricker, Vickerman, Dongari-Bagtzoglou (2014), onde os biofilmes foram cultivados sob fluxo salivar *in vitro*, e em condições estáticas em placas de 96 poços, demonstrou que *S. gordonii*, um membro da microflora residente da cavidade oral de seres humanos, produz sinais difusíveis que promovem a transformação de levedura de *C. albicans* para hifas. Essa transformação demonstrou uma relação com o aumento da biomassa do biofilme formado por essas duas espécies em condições estáticas. Diferente do que ocorreu em nosso estudo quando se verificou que substâncias produzidas por *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* são capazes de promover a transformação de levedura para pseudo-hifa de *C. tropicalis* (Figuras 14, 15 e 16), sem interferir na formação e desenvolvimento do biofilme da referida levedura (Figura 13). Assim, substâncias presentes no sobrenadante de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* são capazes de induzir mudanças na morfologia da referida levedura.

A transição de levedura para hifa ou pseudo-hifa (filamentação) em *Candida* pode ser desencadeada por moléculas QS como o tirosol, que induz a filamentação e o farnesol, que é capaz de inibi-la. O farnesol pode estar envolvido na virulência de *Candida*, pois estirpes não produtoras são menos virulentas. Além de moléculas QS, a mudança morfológica de *Candida* pode ser por meio de peptideoglicanos, principal componente da parede celular de bactérias, liberadas durante seu crescimento (MÉAR *et al.*, 2013).

Bamford e colaboradores (2009) também mostraram que *S. gordonii* é capaz de aderir às hifas de *C. albicans*, em locais específicos. Estas observações sugerem que existe uma grande heterogeneidade na expressão de receptores celulares no interior do biofilme e, especialmente nas hifas de *C. albicans*. Além disso, a presença de células de *S. gordonii* induziu a formação de hifas de *C. albicans* mediada por fatores solúveis, produzidos por *S. gordonii*.

Além da difusão de moléculas de sinalização, a formação de hifas ou pseudo-hifas pode ser induzida por várias condições ambientais, dentre as quais se inclui o pH, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio) e a quantidade de CO₂ e O₂ (SAITO *et al.*, 2013).

Em modelos de biofilmes com espécies mistas há evidências que a formação de hifas pode ser mediada, pelo menos em parte, por fatores solúveis liberados por estreptococos orais (SILVERMAN *et al.*, 2010). Assim, as bactérias *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* liberam substâncias que induzem a transformação de levedura para hifas, como

pode ser visto nas figuras 14, 15 e 16. A formação de hifas ou pseudo-hifas pelas espécies de *Candida* tem sido relacionada ao aumento de sua virulência, pois tal forma favorece maior aderência e capacidade de invasão aos tecidos do hospedeiro, dificultando a fagocitose pelo sistema imune.

Em recente estudo Silva *et al.* (2011) demonstraram a importância da forma filamentosa (pseudo-hifas) de *C. tropicalis*, ao verificar sua capacidade de invadir tecidos e causar infecções graves. Ou seja, as hifas desempenham papel fundamental na invasão de tecidos, e pesquisas *in vitro*, já mostraram que *C. albicans*, que não são capazes de formar hifas exibiram reduzida capacidade de invasão aos tecidos.

Desta forma, bloquear as vias pelas quais ocorre a mudança morfológica em leveduras como *C. tropicalis*, *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, seria uma potencial estratégia para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (SAITO *et al.*, 2013). No entanto, a relevância dessas interações permanece controversa, especialmente em modelos animais e *in vitro*. Além disso, *in vivo*, o envolvimento do sistema imune pode influenciar e ser influenciado por estas interações (MÉAR *et al.*, 2013).

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo essa transição é desencadeada por substâncias produzidas pelos estreptococos, presente em seus sobrenadantes, sugere assim que tais substâncias modulam o comportamento de *C. tropicalis*, usando sinais extracelulares QS ou peptídeoglicanos que acionam uma das vias responsáveis pela transformação da forma de levedura para a forma de pseudo-hifa: (1) Cascata de MAP quinase e a (2) cAMP/via proteína quinase A (PKA) (SAITO *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Xu e colaboradores (2008), puderam observar como peptídeoglicanos agem como um sinal capaz de influenciar o desenvolvimento de *C. albicans*. Os fragmentos de peptídeoglicano identificados no sangue humano são potentes indutores de hifas em *C. albicans*. Este peptídeoglicano é o muramil dipeptídeo, que entra nas células fúngicas e se ligam a uma adenilato ciclase específica que induz a produção de cAMP e posterior desenvolvimento de hifas. Mamíferos não podem produzir ácido murâmico, sugerindo que as altas quantidades desses compostos encontrados no sangue humano são produzidas originalmente pelos micro-organismos da microbiota intestinal.

Assim, é possível que esta seja a via pela qual *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* induzam a transformação de levedura para pseudo-hifa em *C. tropicalis*, visto que muramil dipeptídeo está presente em bactérias comensais e, é possível que em infecções sistêmicas, causadas por bactérias, haja uma elevada produção dessas moléculas que,

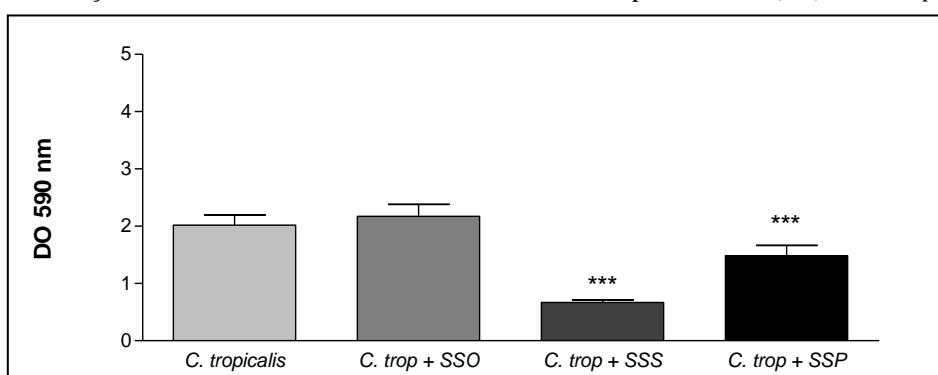
consequentemente induzem a formação de hifas em *C. albicans*, proporcionando o aumento de sua virulência (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

No entanto, a identificação e caracterização dessas substâncias e seus mecanismos de ação presentes nos referidos estreptococos, configuram-se como importantes para um melhor entendimento das infecções causadas por *Candida*, bem como o desenvolvimento de ferramentas que possam auxiliar no controle de tais infecções.

7.3 Efeito dos metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante de *S. oralis* (SSO), *S. sanguinis* (SSS) e *S. parasanguinis* (SSP) no biofilme pré-formado de *C. tropicalis*

O efeito de SSO, SSS e SSP sobre o biofilme pré-formado de *C. tropicalis* (6 horas) revelou que o sobrenadante de *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* foram capazes de reduzir de forma significativa o desenvolvimento do biofilme de *C. tropicalis* após uma hora de contato com os mesmos, com exceção de SSO (Figura 17). Este resultado está de acordo com as conclusões de Diaz *et al.* (2012) de que *S. oralis* não afeta o biofilme de *C. albicans*. Para tanto, os referidos autores utilizaram um sistema de células em fluxo que permite a formação de biofilme sob condições que simulam o ambiente na mucosa oral e esofágica. No mesmo estudo também mostraram que *S. oralis* e *C. tropicalis* apresentam uma relação de mutualismo, onde *S. oralis* facilita a invasão das mucosas oral e esofágica por *C. albicans*, promovendo sua filamentação e, esta por sua vez, permite o desenvolvimento do biofilme de *S. oralis*.

Figura 17 – Avaliação do efeito do SSO, SSS e SSP sobre o biofilme pré-formado (6 h) de *C. tropicalis*



Fonte: Próprio autor. Formação do biofilme de *C. tropicalis* (■), e do biofilme com sobrenadante filtrado (filtro milipore 0,22μm) de *S. oralis* (SSO)+ *C. tropicalis* (■), *S. sanguinis* (SSS)+ *C. tropicalis* (■), *S. parasanguinis* (SSP)+ *C. tropicalis* (■). Biofilmes formados por 17 horas. *** $p<0,01$ em relação à levedura, n=6.

Resultados semelhantes foram encontrados por Thein, Samaranayake e Samaranayake (2006), quando avaliaram o efeito de oito bactérias orais, dentre elas *Streptococcus mutans*, em diferentes concentrações na formação do biofilme de *C. albicans*. Seis das oito bactérias provocaram uma redução significativa no número de leveduras viáveis no biofilme bacteriano. Estes dados indicam que as populações bacterianas orais podem interagir com leveduras a fim de modular a natureza do biofilme. Tal fato pode estar relacionado com o contato entre as células bacterianas ou a liberação de metabólitos.

Em nosso estudo, ao avaliarmos o efeito do sobrenadante puro (100%) de *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* durante 1 hora no biofilme pré-formado, verificamos que SSS e SSP interferiram de forma significativa no desenvolvimento do biofilme de *C. tropicalis* (Figura 17). Além disso, SSS e SSP também demonstraram maior capacidade de induzir a formação de hifas (Figuras 14, 15 e 16). Estes dados sugerem que há uma redução proporcional da biomassa do biofilme ao aumento no número de hifas produzidas pela referida levedura. É possível que a presença de substâncias produzidas pelos estreptococos e que estão presentes em seus sobrenadantes influenciem o comportamento de *C. tropicalis* nas referidas situações, ou seja, quando existe um favorecimento da formação de hifas, temos uma consequente diminuição do desenvolvimento do biofilme. Isso talvez possa favorecer a aplicação de agentes antimicrobianos durante o ataque a biofilmes de *Candida*.

A levedura *C. albicans* é a espécie de *Candida* mais comum em infecções fúngicas, é também a mais virulenta. No entanto, *C. tropicalis* emergiu nas últimas décadas como um patógeno clinicamente importante, especialmente quando nos referimos a infecções fúngicas invasivas. Porém, pouco se sabe sobre sua capacidade de adesão, invasão e diversidade genética (COSTA *et al.*, 2012). Portanto, é imprescindível que se realize estudos mais aprofundados que proporcionem um melhor conhecimento de suas características, fatores de virulências e relações que estabelecem com outros micro-organismos.

Capítulo 8 – Conclusões

8 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que substâncias solúveis produzidas por *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. parasanguinis* induzem a formação de hifas de *C. tropicalis* sem interferir no crescimento planctônico. Além de diminuir drasticamente o desenvolvimento do biofilme dessa levedura quando em contato com o sobrenadante de *S. sanguinis* e *S. parasanguinis*. Tal fato reforça a ideia de que existe grande heterogeneidade dentro de biofilmes polimicrobianos, especialmente entre leveduras e bactérias.

A compreensão e identificação dos mecanismos moleculares e metabólitos liberados durante a interação entre leveduras e bactérias podem levar ao desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos que podem ser utilizados para o controle de doenças infecciosas.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; KOVÁCS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S.. Biofilm Formation and Dispersal in Gram-positive Bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 22, p. 172-179, 2011.
- ALI, S. M. F.; TANWIR, F. Oral Microbial Habitat a Dynamic Entity. **Journal of Oral Biology and Craniofacial research**. v. 2, n. 3, p. 181-187, sept./dec. 2012.
- BAMFORD, C. V.; D'MELLO, A.; NOBBS, A. H.; DUTTON, L. C.; VICKERMAN, M. M.; JENKINSON, H. F. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation. **Infection and Immunity**. v. 77, n. 9, p. 3696-3704, sept. 2009.
- BANDARA, H. M. H. N.; YAU, J. Y. Y.; WATT, R. M.; JIN, J.; SAMARANAYAKE, L. P. *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate *in vitro* *Candida* biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 1623-1631, 2009.
- BENDAOUD, M.; VINOGRADOV, E.; BALASHOVA, N. V.; KADUORI, D. E.; KACHLANY, S. C.; KAPLAN, J. B.. Broad-Spectrum Biofilm Inhibition by *Kingella kingae* Exopolysaccharide. **Journal of Bacteriology**. v. 193, n. 15, p. 3886, aug. 2011.
- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J-L. Metabolite induction via micro-organism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**. v. 32, n. 2, p. 243-550, mar. 2014.
- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos) – Universidade do Minho, Portugal, 2004.
- CARRILLO, E. L.; BATISTA, N. M. M.; PÉREZ, L. S.; TAVIRA, J. A. Factors correlated with developing caries during orthodontic treatment: Changes in saliva and behavioral risks. **Journal of Dental Sciences**. v. 07, p. 218-223, 2012.
- CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W-R.; MACEDO, A. J. Micro-organismos em favor da saúde humana. **Revista Liberato**, v. 9, n. 11, 2008.
- CERCA, N. JEFFERSON, K. K. Que vantagens têm os microrganismos em formar um biofilme?. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto: Publindústria, 2012. Cap. 2, p. 11-16.
- CIRASOLA, D.; SCIOTA, R.; VIZZINI, L.; RICUCCI, V.; MORACE, G.; BORGHI, E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. **Future Microbiology**. v. 8, n. 6, p. 799-805, 2013.
- CHEN, L.; GE, X.; DOU, Y.; WANG, X.; PATEL, J. R.; XU, P. Identification of Hydrogen Peroxide Production-Related genes in *Streptococcus sanguinis* and their Functional Relationship with Pyruvate Oxidase. **Microbiology**. v. 157, p. 13-20, 2011.

- CORCUERA, M. T.; GÓMEZ-LUS, M. L.; GÓMEZ-AGUADO, F.; MAESTRE, J. R.; RAMOS, M. C.; ALONSO, M. J.; PRIETO, J. Morphological Plasticity of *Streptococcus oralis* Isolates for Biofilm Production, Invasiveness, and Architectural Patterns. **Archive of Oral Biology**. v. 58, p. 1584-1593, 2013.
- COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; LAVRADOR, M. A. S.; BARUFFI, M. D.; CANDIDO, R. C. Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. **Mycoses**. v. 55, p. 97-105, 2012.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P.. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**. v. 284, p. 1318-1322, may. 1999.
- CRUZ, M.C.; ROMERO, E. L.; CASTRO, J. C. V.; BACA, E. R. *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiology**. v. 7, n. 6, p. 755-771, 2012.
- CULP, D. J.; ROBINSON, B.; PARKKILA, S.; PAN, P.; CASH, M. N.; TROUNG, H. N.; HUSSEY, T. W.; GULLETT, S. L. Oral colonization by *Streptococcus mutans* and caries development is reduced upon deletion of carbonic anhydrase VI expression in saliva. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1812, n. 12, p. 1567-1576, dec. 2011.
- DIAZ, P. I.; XIE, Z.; SOBUE, T.; THOMPSON, A.; BIYIKOGLU, B.; RICKER, A.; IKONOMOU, L.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Synergistic interaction between *Candida albicans* and comensal oral Streptococci in a novel *in vitro* mucosal model. **Infection and Immunity**. v. 80, n. 2, p. 620-632, 2012.
- EL-AZIZI, M. A.; STARKS, S. E.; KHARDOR, N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, p. 1067-1073, 2004.
- FALSETA, M. L.; KOO, H. Beyond Mucosal Infection: a Role for *C. albicans*-*Streptococcal* Interactions in the Pathogenesis of Dental Caries. **Current Oral Health Reports**. v. 1, p. 86-93, 2014.
- FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The Biofilm Matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, sept. 2010.
- FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural Architecture of colonies of Different Morphologies Produced by Phenotypic Switching of a Clinical Strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by Variant Phenotypes. **Micron**. v. 42, p. 726-732, 2011.
- GARNETT, J. A.; SIMPSON, P. J.; TAYLOR, J.; BENJAMIN, S. V.; TAGLIAFERRI, C.; COTA, E.; CHEN, Y.; WU, H.; MATTHEWS, S. Structural Insight Into the Role of *Streptococcus parasanguinis* Fap1 within Oral Biofilm Formation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 417, n. 1, p. 421-426, jan. 2012.
- GREGUŠ, P.; VIČKOVA, H.; BRUCHTA, V.; KESTŘANEK, J.; KŘIVČIKOVA, L.; NOVAKOVA, L. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 53, p. 674-681, 2010.

HARA, A. T.; ZERO, D. T. The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. **Dental Clinics of North America**. v. 54, n. 3, p. 455-467, july 2010.

HENRIQUE, M.; NEGRI, M.; SILVA, S. O impacto clínico de biofilmes de espécies de *Candida*. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto: Publindústria, 2012. Cap. 11, p. 95-103.

HOGAN, D. A.; KOLTER, R. *Pseudomonas-Candida* Interactions: An Ecological Role for Virulence Factors. **Science**. v. 296, june 2002.

JANG, Y-J.; SIM, J.; JUN, H-K.; CHOI, B-K. Differential effect of Autoinducer 2 of *Fusobacterium nucleatum* on Oral Streptococci. **Archives of oral biology**. v. 58, p. 1594-1602, 2013.

JAROSZ, L. M.; DENG, D. M.; VAN DER MEI, H. C; CRIELAARD, W.; KROM, B. P. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. **Eukaryotic Cell**. v. 8, n. 11, p.1658-1664, nov. 2009.

KOLENBRANDER, P. E. Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactiona and Genetic Systems. **Annual Reviews of Microbiology**. v. 54, p. 413-37, 2000.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 471-480, apr. 2010.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J.. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 3, 2013.

KUBONIWA, M.; TRIBBLE, G. D.; HENDRICKSON, E. L.; AMANO, A.; LAMONT, R. J.; HACKETT, M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. **Expert Review of Proteomics**. v. 9, n. 3, p. 311-323, june 2012.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F. G. Saliva and Dental Pellicle – A Review. **Advances in Dental Research**. v. 14, p. 22-28, 2000.

LIMA, D. P.; DINIZ, D. G.; MOIMAZ, S. A. S.; SUMIDA, D. H.; OKAMOTO, A. C. Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 3, p. e184-e188, mar. 2010.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R.. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 2 (7), 2010.

LORENZO, J. L. Placa (Biofilme) Dental. In: LORENZO, J. L. (Org.). **Microbiologia para o Estudante de Odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. Cap. 6, p. 73-85.

MANDALA, S. M.; MIGLIOLO, L.; FRANCO, O. L.; GHOSH, A. K. Identification of an antifungal peptide from *Trapa natans* fruits with inhibitory effects on *Candida tropicalis* biofilm formation. **Peptides**. v. 32, p. 1741-1747, 2011.

MARSH, P.; MARTIN, M. V.. **Microbiologia Oral**. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005.

MARTINS, M.; MONTEIRO, D. R.; OLIVEIRA, R. Biofilmes orais. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto: Publindústria, 2012. Cap. 9, p. 71-83.

McDONALD, E. E.; GOLDBERG, H. A.; TABBARA, N.; MENDES, F. M.; SIQUEIRA, W. L. Histatin 1 Resists Proteolytic Degradation when Adsorbed to Hydroxyapatite. **Journal of Dental Research**. v. 90, n. 2, p. 268-272, 2011.

McDOUGALD, D.; RICE, S. A.; BARRAUD, N.; STEINBERG, P. D.; KJELLEBERG, S.. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, jan. 2012.

MÉAR, J. -B.; KIPNIS, E.; FAURE, E.; DESSEIN, R.; FAURE, K.; GUERY, B. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association?. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 43, p. 146-151, 2013.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3^a ed, São Paulo: MichalanyLtda, 1998.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm um for Review. **Trends in Microbiology**. v. 17, n. 2, p. 73-87, feb. 2009.

NEGRI, M.; SILVA, S.; BREDA, D.; HENRIQUE, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida tropicalis* biofilms: Effect on urinary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**. v. 53, p. 95-99, 2012a.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUE, M.; OLIVEIRA, R. Insights in to *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**. v. 31, p. 1399-1412, 2012b.

NETEA, G. M.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**. v. 06, n. 01, p. 67-78, jan. 2008.

NETT, J.; LINCOLN, L.; MARCHILLO, K.; MASSEY, R.; HOLOYDA, B. H.; VanHANDEL, M.; ANDES, D. Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p. 510-520, feb. 2007.

NEYRAUD, E.; PALICKI, O.; SCHWARTZ, C.; NICKLAUS, S.; FERON, G. Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. **Archives of Oral Biology**. v. 57, n. 5, p. 556-566, may 2012.

NIKAWA, H.; EGUSA, H.; MAKIHIRA, S.; OKAMOTO, T.; KURIHARA, H.; SHIBA, H.; AMANO, H.; MURAYAMA, T.; YATANI, H.; HAMADA, T. Na *in vitro* evalution of the adhesion of *Candida* species to oral and lung tissue cells. **Mycoses**. v. 49 (1), p. 14-17, 2006.

- PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nature Reviews Microbiology**. v. 08, n. 05, p. 340-349, may 2010.
- PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A.; O'MAY, G. A.; COSTERTON, J. W.; SHIRTLIFF, M. E. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 25, n. 1, p. 193-213, 2012.
- RAMSEY, M. M.; RUMBAUGH, K. P.; WHITELEY, M. Metabolite Cross-Feeding Enhances Virulence in a Model Polymicrobial Infection. **Plos Pathogens**. v. 7, n. 3, mar 2011.
- RENDUELES, O.; TRAVIER, L.; LATOUR-LAMBERT, P.; FONTAINE, T.; MAGNUS, J.; DENAMUR, E.; GHINGO, J.-M. Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. **mBio**. v. 2, n. 3, may/june 2011.
- RICKER, A.; VICKERMAN, M.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*. **Journal of Oral Microbiology**. v. 6, jan. 2014.
- ROGERS, J. D., PALMER, R. J., KOLENBRANDER, P. E., SCANNAPIECO, F. A. Role of *Streptococcus gordonii* Amylase-Binding Protein A in Adhesion to Hydroxyapatite, Starch Metabolism, and Biofilm Formation. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 11, p. 7046-7056, nov. 2001.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potencial of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 84, p. 1-5, 2011.
- SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. Biofilm: A dental microbial infection. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**. v. 2, n. 1, jan. 2011.
- SAITO, H.; TAMURA, M.; IMAI, K.; ISHIGAMI, T.; OCHIAI, K. Catechin inhibits *Candida albicans* dimorphism by disrupting CeK1 phosphorylation and cAMP synthesis. **Microbial Pathogenesis**. v. 56, p. 16-20, 2013.
- SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. S. M. *Candida* species: currente formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, p. 10-24, 2013.
- SCANNAPIECO, F. A. Saliva-Bacterium Interactions in Oral Microbial Ecology. **Critical Review In Oral Biology And Medicine**. v. 5, n. 3-4, p. 203-248, 1994.
- SGHERRI, C.; PORTA, A.; CATELLANO, S.; PINZINO, C.; QUARTACCI, M. F.; CALUCCI, L. Effect of azole treatments on the physical properties of *Candida albicans* plasma membrane: A spin probe EPR study. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1838, p. 465-473, 2014.
- SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 299, p. 1-8, 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUE, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; ZEVEDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**. v. 19, n. 5, may 2011.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 36, p. 288-305, 2012.

SILVERMAN, R. J.; NOBBS, A. H.; VICKERMAN, M. M.; BARBOUR, M. E.; JENKINSON, H. F. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* Ssp B adhesin promotes development of Mixed-Species communities. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4644-4652, 2010.

SIQUEIRA, W. L.; CUSTODIO, W.; McDONALD, E. E. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. **Journal of Dental Research**. V. 91 (12), pp. 1110-1118, dec. 2012.

SOUSA, A. M.; COELHO, F. L.; PEREIRA, M. O. Estratégias de controle de biofilmes com recurso a produtos naturais antimicrobianos. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Porto: Publindústria, 2012. Cap. 24, p. 251-256.

SUH, J.D.; RAMAKRISHNAN, V.; PALMER, J. N.. Biofilms. **Otolaryngologic Clinics of North America**. v. 43 (3), p.521-530, 2010.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Archives of Oral Biology**. v. 51, p. 672-680, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VARGAS, L. O. S.; BARRAZA, D. E.; GUILLEN, A. J. P.; CACERES, R. R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Archives of oral biology**. v. 58, p. 1318-1326, 2013.

WARGO, M. J.; HOGAN, A. D. Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Current Opinion in Microbiology**. v. 9, p. 359-364, 2006.

WHITTAKER, C. J.; KLIER, C. M.; KOLENBRANDER, P. E. Mechanisms of Adhesion by Oral Bacteria. **Annual Review Microbiology**. v. 50, p. 513-(40), 1996.

XIAO, J.; KLEIN, M. I.; FALSETTA, M. L.; LU, B.; DELAHUNTY, C. M.; YATES, J. R.; HEYDORN, A.; KOO, H. The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction Between 3D Architecture and Virulence of a Mixed-Species Oral Biofilm. **Plos Pathogens**. v. 8, n. 4, 2012.

XU, H.; SOUBE, T.; THOMPSON, A.; XIE, Z.; POON, K.; RICKER, A.; CERVANTES, J.; DIAZ, P. I. DONGARI-BAGTZOGLO, A. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. **Cellular Microbiology**. v. 16 (2), p. 214-231, 2014.

XU, P.; ALVES, J. M.; KITTEN, T.; BROWN, A.; CHEN, Z.; OZAKI, L. S.; MANQUE, P.; GE, X.; SERRANO, M. G.; PUIU, D.; HENDRICKS, S.; WANG, Y.; CHAPLIN, M. D.; AKAN, D.; PAINK, S.; PETERSON, D. L.; MACRINA, F. L.; BUCK, G. A. Genome of the Opportunistic Pathogen *Streptococcus sanguinis*. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n. 8, p. 3166-3175, apr. 2007.

XU, X-L.; LEE, R. T. H.; FANG, H-M.; WANG, Y-M.; LI, R.; ZOU, H.; ZHU, Y.; WANG, Y. Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hiphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. **Cell Host & Microbe**. v. 4, p. 28-39, july 2008.

YAO, Y.; GROGAN, J.; ZEHNDER, M.; LENDEMANN, U.; NAM, B.; WU, Z.; COSTELLO, C. E.; OPPENHEIM, F. G. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. **Archives of Oral Biology**. v. 46 (4), p. 293-303, 2001.

ZIJNE, V.; VAN LEEUWEN, M. B. M.; DEGENER, J. E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; HARMSEN, J. M. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. **PLoS ONE**. v. 5, n. 2, 2010.