



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**WANESSA FERNANDES MATIAS REGIS**

**EFEITO DO SOBRENADANTE DE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* EM  
BIOFILMES MONO E DUO-ESPÉCIE**

**FORTALEZA**

**2017**

**WANESSA FERNANDES MATIAS REGIS**

**EFEITO DO SOBRENADANTE DE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* EM  
BIOFILMES MONO E DUO-ESPÉCIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

**FORTALEZA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Regis, Wanessa Fernandes Matias.

EFEITO DO SOBRENADANTE DE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* EM BIOFILMES  
MONO E DUO-ESPÉCIE / Wanessa Fernandes Matias Regis. – 2017.  
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

1. Interações. 2. Biofilmes. 3. Polissacarídeos. 4. *Streptococcus mutans*. I. Título.

CDD 615.1

---

**WANESSA FERNANDES MATIAS REGIS**

**Efeito do sobrenadante de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em biofilmes mono e duo-espécie**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage

Defendida e aprovada em: 12/12/2017

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Duarte

Indiana University

A Deus.

Aos meus pais, Wagner e Umbelina.

Ao meu irmão , Wagner Filho.

Ao meu marido, Anisio.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **DEUS**, por tanto amor.

Aos meus pais, **LUIZ WAGNER FERNANDES MATIAS** e **UMBELINA REGIS MATIAS**, por todo conforto, por serem meu porto seguro, por toda educação e todo amor incondicional. Meus exemplos de ternura e bondade.

Ao meu irmão, **LUIZ WAGNER FERNANDES MATIAS FILHO**, por ser meu protetor e amigo e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu marido, **ANISIO SILVESTRE PINHEIRO SANTOS FILHO**, por todo incentivo e compreensão e por todo apoio prestado nos momentos em que mais precisei.

À minha professora orientadora, Dra. **LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES GERAGE**, profissional admirável em que pude ter a honra de ser orientanda. Agradeço por me conceder a chance de participar dessa equipe maravilhosa, por todas as oportunidades, formação científica e pessoal, paciência, ensinamentos e por ser referência não só como pesquisadora, mas também como pessoa.

À **SARAH FLORINDO DE FIGUEIREDO GUEDES**, pela amizade, força, incentivo nos momentos em que mais precisei, por toda dedicação e ensinamentos.

Ao meu amor canino **BOB**, por todo amor devotado, carinho e companhia durante as madrugadas.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Ceará (UFC), na pessoa do reitor, **PROF. DR. HENRY DE HOLANDA CAMPOS**.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE/UFC), na pessoa de sua diretora Profa. Dra. **LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES GERAGE**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM-UFC), pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-UFC) por todo apoio durante a minha pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante todo o período do meu mestrado.

A toda minha família e amigos de Macapá, que mesmo longe sempre se fazem presente, me apoiam e me incentivam.

Aos professores do PPGMM/UFC que compartilharam seus conhecimentos, em especial a **PROFA. DRA. CIBELE BARRETO MANO DE CARVALHO** e **PROFA. DRA. DÉBORA CASTELO BRANCO DE SOUZA COLLARES MAIA**.

Aos professores, **PROFA. DRA. SIMONE DUARTE**, **PROFA. DRA. DANIELA DA SILVA BEZERRA** e **PROF. DR. EDSON HOLANDA TEIXEIRA**, por todas as contribuições.

Aos funcionários do Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), em especial, **CAROLINDA VILMA SOARES DE OLIVEIRA**, pela grande ajuda e disponibilidade.

Ao técnico do laboratório de pesquisa em odontologia **DAVID QUEIROZ DE FREITAS**, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

À todos os colegas da Pós-graduação da UFC, **WESLANNY DE ANDRADE MORAIS**, **RAMILLE ARAÚJO LIMA**, **PAULO GOBERLÂNIO DE BARROS SILVA**, **DANIELA NUNES PINTO**, **MYRNA MARIA ARCANJO FROTA**, **PEDRO HENRIQUE ACIOLY**

**GUEDES PEIXOTO VIEIRA, CHRISTER JOSÉ OCADAQUE, HÉLLEN SÚZANY FREIRE SILVA, ADÁLIA SAMARA GADÊLHA DE HOLANDA, ANA CATARINA MARTINS REIS, FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA**, pelo companheirismo, amizade, ajuda e troca de conhecimentos.

À todos que durante o período do meu mestrado contribuíram direta ou indiretamente na minha caminhada e que de alguma forma me ajudaram na concretização deste estudo, muito obrigada.

“Nothing great was ever achieved without enthusiasm.”

Ralph Emerson

## RESUMO

O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é uma das bactérias mais comuns em biofilmes cariogênicos. Considerando a natureza polimicrobiana da cárie dentária, relações simbióticas entre diferentes reinos devem ser estudadas. Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ação do sobrenadante de *Streptococcus mutans* e/ou *Candida albicans* (*C. albicans*) na formação, composição e morfologia de biofilme mono (M) e duo-espécie (D) desses microrganismos. Foi realizado o teste de adesão microbiana ao hidrocarboneto, para avaliar a hidrofobicidade das células, para o ensaio microbiológico, os biofilmes M e D foram crescidos *in vitro*, na presença dos sobrenadantes estudados juntos ou isolados, cultivados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) durante 48 h (5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C). Após o tempo de crescimento estabelecido, os biofilmes foram coletados e semeados para análise das UFC (Unidade de Formação de Colônias) e quantificação dos polissacarídeos extracelulares solúveis (PECs) e insolúveis (PECi) para determinação dos polissacarídeos totais (PECT). A morfologia do biofilme foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal a Laser (MCL). Os dados foram analisados utilizando ANOVA seguido pelo teste bonferroni, a um intervalo de confiança de 95% e nível de significância fixado em 5%. A hidrofobicidade relativa (HR) das células de *S. mutans* aumentou em 6,8 vezes na presença do sobrenadante de *C. albicans*, enquanto que a HR da *C. albicans* aumentou 1,2 vezes na presença do seu próprio sobrenadante. A biomassa do biofilme M de *S. mutans* não apresentou diferença estatística na presença dos sobrenadantes, contudo, em relação de *C. albicans* houve aumento na biomassa quando cultivado com sobrenadante de *S. mutans* (p=0,0487). Na Contagem de *S. mutans*, no biofilme D, houve redução das UFC na presença do sobrenadante de *C. albicans* (p=0,0454). Com sobrenadante *S. mutans* houve aumento significativo (p<0,05) na produção de PECT, tanto em biofilmes M quanto em D. Os dados de MEV sugerem um aumento na filamentação *C. albicans* quando em contato com os sobrenadantes testados. Em relação à MCL, foi observado um aumento da biomassa de biofilmes de *S. mutans* quando em contato com os dois sobrenadantes. Conclui-se que, o sobrenadante de *S. mutans* isoladamente influencia no aumento da biomassa de *C. albicans* e no aumento da produção de PECT de ambos os microrganismos estudados. Indicando interações entre estes microrganismos no biofilme.

**Palavras-chave:** Interações. Biofilmes. Polissacarídeos. *Streptococcus mutans*

## ABSTRACT

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is one of the most common bacteria in cariogenic biofilms. Considering the polymicrobial nature of dental caries, symbiotic relationships between different kingdoms should be studied. Thus, the aim of the present study was to evaluate the action of the supernatant of *Streptococcus mutans* and/or *Candida albicans* on the formation, composition and morphology of mono (M) and dual-specie (D) biofilms of these microorganisms. The test of microbial adhesion to the hydrocarbon was carried out to evaluate cell hydrophobicity. For the microbiological assay, the biofilms were grown *in vitro* in the presence of the studied supernatant combined or isolated, cultured in RPMI medium for 48 hours (5% CO<sub>2</sub> at 37 °C). After established growth period, the biofilms were collected and seeded for CFU (Colony Forming Unit) analysis and quantification of extracellular polysaccharides (EPS-insoluble and soluble) to determine the total polysaccharides (PECT). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Laser Confocal Microscopy (LCM) examined the biofilm morphology. Data was analyzed using ANOVA, followed by the bonferroni test, with a significance level set at 5%. The relative hydrophobicity (RH) of *S. mutans* cells increased by 6.8 fold in the presence of the *C. albicans* supernatant, whereas the HR of *C. albicans* increased 1.2 fold in the presence of its own supernatant. Regarding M biofilms of *S. mutans* did not show statistical difference in the presence of supernatants, however, in relation to *C. albicans* was an increase counts was observed when cultured with *S. mutans* supernatant (p=0.0487). For D biofilms, the presence of *C. albicans* supernatant significantly reduced *S. mutans* counts (p=0.0454). *S. mutans* supernatant there was a significant (p <0.05) increase in PECT production in both M and D biofilms. The SEM data suggest an increase in *C. albicans* filamentation when in contact with the supernatants tested. In relation to the LCM, an increase of the biofilm biomass of *S. mutans* was observed when in contact with the two supernatants. It is concluded that the supernatant of *S. mutans* alone influences in the increase of *C. albicans* and in the increase of the PECT production of both microorganisms studied indicating interactions between these microorganisms in the biofilm.

**Keywords:** Interactions. Biofilms. Polysaccharides. *Streptococcus mutans*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química das moléculas de (A) farnesol e (B) tirosol .....	15
Figura 2	Desenho esquemático da formação do biofilme de <i>C. albicans</i> .....	22
Figura 3	Obtenção do sobrenadante .....	33
Figura 4	Equação para determinação do Índice de Hidrofobicidade Superficial Celular em células crescidas em contato com os sobrenadantes testados .....	34
Figura 5	Disposição dos grupos experimentais em placa de 24 poços .....	34
Figura 6	pHmetro TEC-MP .....	35
Figura 7	Coleta do biofilme sobre discos de hidroxiapatita .....	36
Figura 8	Curva padrão da glicose .....	37
Figura 9	Porta amostra do microscópio varredura Inspect S50 .....	38
Figura 10	Hidrofobicidade relativa das células de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> com e sem sobrenadantes .....	40
Figura 11	Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos na formação de biofilme monoespécie <i>in vitro</i> formado por <i>S. mutans</i> sozinho (Controle) quando em contato com os sobrenadantes (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sb. Sm) ou <i>C. albicans</i> (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças .....	41
Figura 12	Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos na formação de biofilme monoespécie <i>in vitro</i> formado por <i>C. albicans</i> cultivada de forma isolada (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sb. Sm) ou de <i>C. albicans</i> (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças .....	42
Figura 13	Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg ( $\text{Log}_{10}$ ) de <i>S. mutans</i> no biofilme duo-espécie <i>in vitro</i> formado por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> (Controle), quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sb. Sm) e com o sobrenadante de <i>C. albicans</i> (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças .....	43
Figura 14	Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg ( $\text{Log}_{10}$ ) de <i>C. albicans</i> no biofilme duo-espécie <i>in vitro</i> formado por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sb. Sm) e <i>C. albicans</i> (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças .....	43
Figura 15	Média e desvio padrão dos valores de pH do biofilme monoespécie formado por <i>S. mutans</i> (a), <i>C. albicans</i> (b) e pelo biofilme duo-espécie (c) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sm) e <i>C. albicans</i> (Ca).....	44
Figura 16	Média e desvio padrão dos valores referentes a análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por <i>S. mutans</i> (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sm) e <i>C. albicans</i> (Ca). Letras diferentes denotam diferença .....	45
Figura 17	Média e desvio padrão dos valores referentes a análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por <i>C. albicans</i> (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sm) e <i>C. albicans</i> (Ca). Letras diferentes denotam diferença .....	45
Figura 18	Média e desvio padrão dos valores referentes a análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme duo-espécie formado por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de <i>S. mutans</i> (Sm) e <i>C. albicans</i> (Ca), juntos e separadamente Letras diferentes	

	denotam diferença .....	46
Figura 19	MEV do biofilme monoespécie de <i>S. mutans</i> UA159 (aumento de 10.000x) e de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (aumento de 5.000x) - 1) grupo controle, 2) grupo crescido com sobrenadante de <i>S. mutans</i> , 3) grupo crescido com sobrenadante de <i>C. albicans</i> . Seta prata indica grande proximidade entre as células de <i>S. mutans</i> . Seta branca indica resquícios de polissacarídeo em biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> .....	47
Figura 20	MEV dos grupos: 1) Biofilme duo-espécie sem sobrenadante, 2) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de <i>S. mutans</i> , 3) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de <i>C. albicans</i> , 4) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> (aumento de 5.000x). Seta preta indica levedura e setas brancas indicam hifas de <i>C. albicans</i> .....	48
Figura 21	Padrão de formação de biofilme monoespécie de <i>S. mutans</i> sobre discos de hidroxiapatita, (A) Sem sobrenadante, (B) com sobrenadante de <i>S. mutans</i> e (C) com sobrenadante de <i>C. albicans</i> .....	50
Figura 22	Padrão de formação de biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> formado por (A) <i>C. albicans</i> (B) sobrenadante de <i>S. mutans</i> (C) <i>C. albicans</i> com sobrenadante de <i>C. albicans</i> .....	51
Figura 23	Padrão de formação de biofilme duo-espécie formado por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> sobre discos de hidroxiapatita, (A) Sem sobrenadante, (B) com sobrenadante de <i>S. mutans</i> e (C) com sobrenadante de <i>C. albicans</i> e (D) com ambos os sobrenadantes.....	51
Figura 25	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme monoespécie de <i>S. mutans</i> sobre discos de hidroxiapatita.....	52
Figura 26	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme monoespécie de <i>S. mutans</i> cultivado com o sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre discos de hidroxiapatita.....	52
Figura 27	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme monoespécie de <i>S. mutans</i> cultivado com o sobrenadante de <i>C. albicans</i> sobre discos de hidroxiapatita.....	53
Figura 28	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme de <i>C. albicans</i> .....	53
Figura 29	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme de <i>C. albicans</i> cultivado com o sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre discos de hidroxiapatita .	54
Figura 30	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme de <i>C. albicans</i> cultivado com o sobrenadante de <i>C. albicans</i> sobre discos de hidroxiapatita	54
Figura 31	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> .....	55
Figura 32	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> crescido na presença do sobrenadante de <i>S. mutans</i> .....	55
Figura 33	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> crescido na presença do sobrenadante de <i>C. albicans</i> .....	56
Figura 34	Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> crescido na presença do sobrenadante de <i>C. albicans</i> .....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características das glucosiltransferases do <i>S. mutans</i> .....	19
<b>Tabela 2</b>	Mecanismo de ação de moléculas do <i>quorum sensing</i> de <i>S. mutans</i> .....	22
<b>Tabela 3</b>	Mecanismo de ação de moléculas do <i>quorum sensing</i> de <i>C. albicans</i> .....	25

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1</b>	Grupo e condições experimentais .....	31
<b>Fluxograma 2</b>	Distribuição dos grupos para o ensaio da hidrofobicidade da célula de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEC	Polissacarídeo extracelular
PECs	Polissacarídeo extracelular solúvel
PECi	Polissacarídeo extracelular insolúvel
PECT	Polissacarídeo extracelular total
PIC	Polissacarídeo intracelular
Gbp	Glucan binding proteins(Proteína ligante de glucano)
ALS	Agglutinin-like sequence (Sequencia de algotinina)
HWP	Hyphal wall protein (Proteína da parede da hifa)
EL	Extrato de levedura
YNB	Yeast nitrogen base (Suplemento de nitrogênio para levedura)
BHI	Brain heart infusion (Infusão cérebro coração)
BF	Bactéria-Fungo
LC	Lesão de cárie
BHIYE	Brain heart infusion yeast extract (Infusão cérebro coração com extrato de levedura)
UFC	Unidades formadoras de colônias
HA	Hidroxiapatita
HR	Hidrofobicidade Relativa
MSB	<i>Mitis salivarius</i> bacitracina
rpm	Rotação por minuto
h	Hora
M	Molar
nm	Nanometro
mL	Mililitro
MCL	Microscopia confocal a laser
s	Segundos
g	Gramas
°C	Grau celsius
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Instituto memorial Roswell Park)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
Gtf	Glucosiltransferase
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
D	Biofilme Duo-espécie
M	Biofilme Monoespécie
pH	Potencial hidrogeniônico
DOi	Densidade óptica inicial
DOf	Densidade óptica final
MARS	Morphogenic autoregulatory substance (Substância autorreguladora morfogênica).
ART	Acid tolerance response (Resposta a tolerância ácida)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
CSP	<i>Competence inducing peptide</i>
XIP	<i>SigX Inducing Peptide</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 <i>Streptococcus mutans</i></b> .....	17
<b>2.2 <i>Candida albicans</i></b> .....	20
<b>2.3 Quorum sensing</b> .....	23
<b>2.4 Relações ecológicas entre <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> na cárie dental</b> .....	26
<b>3 PERGUNTA DE PARTIDA</b> .....	28
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	29
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>5.1 Objetivo geral</b> .....	30
<b>5.2 Objetivos específicos</b> .....	30
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>6.1 Delineamento experimental</b> .....	31
<b>6.2 Estirpes microbianas e condições de crescimento</b> .....	32
<b>6.3 Preparo do sobrenadante</b> .....	32
<b>6.4 Ensaio de hidrofobicidade relativa da superfície celular</b> .....	33
<b>6.5 Disposição dos grupos experimentais</b> .....	34
<b>6.6 Mensuração do pH</b> .....	36
<b>6.7 Coleta do biofilme</b> .....	35
<b>6.8 Análise do peso seco do biofilme</b> .....	36
<b>6.9 Extração dos polissacarídeos</b> .....	36
<b>6.10 Análise morfológica e estrutural dos biofilmes</b> .....	38
6.10.1 Microscopia eletrônica de varredura .....	38
6.10.2 Microscopia confocal de varredura a laser .....	38
<b>6.11 Análise estatística</b> .....	39
<b>7 RESULTADOS</b> .....	40
<b>7.1 Ensaio da hidrofobicidade das células</b> .....	40
<b>7.2 Interações entre <i>Streptococcus mutans</i> e <i>C. albicans</i> no biofilme mono e duo-espécie</b> .....	41
.....	
<b>7.2.1 Efeito do sobrenadante de <i>Streptococcus mutans</i> ou de <i>C. albicans</i> sobre a biomassa dos biofilmes monoespécies de <i>Streptococcus mutans</i></b> .....	38
<b>7.2.2 Efeito do sobrenadante de <i>Streptococcus mutans</i> ou de <i>C. albicans</i> sobre a biomassa dos biofilmes monoespécies de <i>C. albicans</i></b> .....	41
<b>7.2.3 Efeito do sobrenadante de <i>Streptococcus mutans</i> e/ou de <i>C. albicans</i> no biofilme duo-espécie sobre a biomassa de <i>S. mutans</i> - UFC/mL/mg</b> .....	42
<b>7.2.4 Efeito do sobrenadante de <i>Streptococcus mutans</i> e/ou de <i>C. albicans</i> no biofilme duo-espécie sobre a biomassa do biofilme de <i>C. albicans</i></b> .....	43
<b>7.3 Mensuração do pH</b> .....	43
<b>7.4 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais (PECT)</b> .....	44

7.4.1 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por <i>S. mutans</i> .....	44
7.4.2 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por <i>C. albicans</i> .....	45
7.4.3 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme duo-espécie formado por <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> .....	46
<b>7.5 Efeito do sobrenadante de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> na morfologia do biofilme mono e duo-espécie por microscopia eletrônica de varredura (MEV).</b>	<b>46</b>
<b>7.6 Efeito dos sobrenadantes de <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i> sobre o padrão de formação dos biofilmes mono e duo-espécies – Microscopia Confocal a Laser .....</b>	<b>50</b>
7.6.1 Análise topográfica do biofilme .....	50
7.6.2 Análise 3D da superfície do biofilme .....	52
<b>8 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>10 DIREÇÕES FUTURAS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Por muitos anos, acreditava-se que todos os microrganismos que habitavam a terra, viviam de forma planctônica, como células de vida livre, mas hoje é amplamente conhecido que a maioria deles vivem principalmente agrupados em biofilmes (GIAOURIS *et al.*, 2015).

O primeiro relato de biofilme microbiano foi o de Antonie van Leeuwenhoek em 1664, quando descreveu à sociedade real da Inglaterra a variedade de microrganismos existentes em placas dentárias, porém somente em 1978, John William Costerton publicou a primeira definição de animálculos, em seu trabalho intitulado: “*how bacteria stick*” e descreveu como: uma comunidade estruturada de células bacterianas embebidas em uma matriz polimérica autoproduzida e aderente a uma superfície inerte ou viva (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; SOLL; DANIELS, 2016). A matriz autoproduzida que recobre esses microrganismos é composta por substâncias poliméricas, formada por polissacarídeos extracelular (PEC), ácido lipoteicóico, lipídeos, proteínas, material genético e água (KLEIN *et al.*, 2015). Os PEC promovem a adesão e coesão microbiana, além de ajudar a moldar a heterogeneidade espacial, metabólica e micro-ambiental do biofilme (WOZNIAK; PARSEK, 2014).

Diversas doenças microbianas são associadas a biofilmes, incluindo algumas que ocorrem na cavidade oral (HE *et al.*, 2017). A cárie é uma doença biofilme açúcar dependente de alta prevalência, onerosa e que compromete a saúde e bem-estar de adultos e crianças (KLEIN *et al.*, 2015). *S. mutans* é um microrganismo reconhecidamente cariogênico, por ser portador de características como, por exemplo, ser um grande produtor de PEC, possuir a capacidade de produzir ácidos orgânicos (acidogenicidade) a partir de carboidratos metabolizados, especialmente na presença de sacarose, sobreviver em ambientes com baixo pH (aciduricidade) e superar espécies não cariogênicas no biofilme dentário (BORGES; CASTILHO; PEREIRA, 2008; LEMOS *et al.*, 2013).

Para produzir PEC, o *S. mutans* secreta enzimas denominadas glucosiltransferases (GTF), que hidrolisam a sacarose, um dissacarídeo formado por glicose e frutose, que apresenta uma ligação glicosídica chamada de atípica, pois envolve os grupos funcionais de ambos os monossacarídeos (BOWEN; KOO, 2011; SPOLIDORIO; DUQUE, 2013).

*S. mutans* é o microrganismo mais estudado quando o assunto é cárie dentária, porém essa bactéria não age sozinha, outros microrganismos também contribuem para o estabelecimento e progresso da doença, tais como, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* e *C. albicans* (RAJA; HANNAN; ALI, 2010; TAKAHASHI; NYVAD, 2011; HWANG *et al.*, 2015).

Resultados de estudos clínicos prévios revelam números elevados de *C. albicans* em lesões de cárie de dentina e cárie severa da infância (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009; FALSETTA *et al.*, 2014; FELDMAN *et al.*, 2016). *Candida albicans* é um microrganismo comensal, polimórfico, residente em mucosa, que pode crescer em três morfologias celulares: levedura, pseudo-hifas e/ou hifas, sendo este último, o tipo morfológico mais virulento (LO *et al.*, 1997; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). Esse fungo possui células hidrofóbicas, produz proteases e apresenta habilidade de adesão em tecidos moles e duros (FERNANDES *et al.*, 2016). Na grande maioria dos casos, convive em equilíbrio com o hospedeiro, todavia, pode se tornar patogênico em períodos de supressão do sistema imunológico (ANDERSON; BENNETT, 2016).

A virulência da *C. albicans* está ligada a uma série de atributos, como por exemplo, transição morfológica, expressão de adesinas, formação de biofilmes e a secreção de enzimas hidrolíticas que permitem que a célula fúngica colonize o hospedeiro e cause doenças locais e sistêmicas, que afetam a pele, o trato gastrointestinal, sistema reprodutor e a cavidade oral (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). A sua capacidade de formar biofilmes torna este fungo extremamente tolerante a antifúngicos comuns e ao sistema imunológico e a sua capacidade de se associar a bactérias, possivelmente, aumenta essa resistência (SHIRTLIFF; PETERS; JABRA-RIZK, 2009; SANDAI *et al.*, 2016).

Na cavidade oral, a co-adesão entre *C. albicans* e bactérias é crucial para a sua colonização e persistência em biofilmes (KOO; BOWEN, 2014), além de fornecer sítios de adesão, os estreptococos excretam lactato que pode atuar como uma fonte de carbono para o crescimento de levedura que, por sua vez, reduz a tensão do oxigênio em níveis preferidos pelos estreptococos e fornece fatores estimulantes do crescimento para as bactérias (FALSETTA *et al.*, 2014).

As associações entre microrganismos de diferentes reinos, em especial entre bactérias e fungos, podem ser antagonistas ou cooperativas (FREY-KLETT *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014). Uma vez juntos dentro de biofilmes, quando em condições propícias, estes organismos podem cooperar uns com os outros para a provisão de substratos, metabólitos e estimuladores

de crescimento, como também pode ocorrer a competição por nutrientes dando origem a interações antagônicas (GREGOIRE *et al.*, 2011). Alguns estudos têm reportado que a presença do *S. mutans* modifica drasticamente o ambiente físico dos biofilmes através de interações interespecies que podem mediar a progressão da cárie (PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2016).

Esse mecanismo de interação ou “comunicação” entre espécies no biofilme é conhecido como *Quorum sensing* (QS), nome dado à forma química de comunicação entre microrganismos da mesma espécie (intraespécie) ou de espécies diferentes (interespecies), que controla diferentes sinais e é essencial para o desenvolvimento do biofilme (LI; TIAN, 2012). Bactérias e fungos utilizam esse mecanismo para monitorar a densidade populacional e o ambiente em que vivem. Para isso, produzem, secretam e detectam pequenos sinais moleculares difusíveis chamados de autoindutores, que estão presentes no sobrenadante microbiano e que aumentam em concentração à medida que a população microbiana cresce, orquestrando a transcrição gênica e a produção proteica (FETZNER, 2015; BODELÓN *et al.*, 2017).

Nas bactérias, o sistema de QS funciona de forma diferenciada para Gram-positivos e Gram-negativos. As moléculas autoindutoras das bactérias Gram-negativas são principalmente, autoindutores tipo I que atravessam membranas e são detectados no citoplasma por proteínas do tipo LuxR (FETZNER, 2015). Em bactérias Gram-positivas, a sinalização de QS depende de oligopeptídeos, que possuem uma grande diversidade estrutural e frequentemente sofrem modificações pós-tradução (VERBEKE *et al.*, 2017). Existe também, moléculas autoindutoras tipo 2 (AI-2), que são produzidas e detectadas tanto por bactérias Gram-positivas quanto por Gram-negativas, conhecidas também como autoindutores universais (GUO *et al.*, 2013).

*S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva que utiliza o sensor de *quorum* para regular a formação e virulência do biofilme, possui pelo menos três genes codificadores: *ComC*, *ComD* e *ComE*, os quais codificam o peptídeo indutor de competência CSP que se liga à membrana histidina-quinase *ComD* e resulta na autofosforilação e ativação do regulador de resposta cognato *ComE*, que modifica e ativa o *sigX*, induzindo sua transcrição (LI; TIAN, 2012; KHAN *et al.*, 2017).

O fungo *C. albicans* foi o primeiro microrganismo eucariota a mostrar moléculas de *quorum sensing* (ALEM *et al.*, 2006). A molécula detectada foi o farnesol (Figura 1A), um

composto alifático, com atividade antibiofilme contra várias espécies de fungos e bactérias (FERNANDES *et al.*, 2016). Essa molécula tem a capacidade de bloquear a transição morfológica de leveduras para hifas, regular a densidade celular em biofilmes e em situações extremas podem causar apoptose (VÍLCHEZ *et al.*, 2010; HORNBY *et al.*, 2001). Além disso, o farnesol pode bloquear a formação de tubos germinativos, porém, não impede o alongamento dos tubos já existentes (LINDSAY *et al.*, 2012).

Sequencialmente, foi identificada a segunda molécula de QS da *C. albicans*: o tirosol (Figura 1B), um composto aromático liberado durante o crescimento da levedura em comunidades microbianas, que acelera a formação dos tubos germinativos (ALEM *et al.*, 2006) e induz a transformação levedura-hifa, porém, pouco se sabe sobre seu efeito em biofilmes (ABDEL-RHMAN; EL-MAHDY; EL-MOWAFY, 2015).

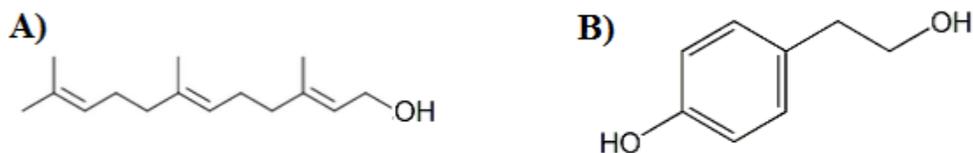


Figura 1. Estrutura química das moléculas de (A) farnesol e (B) tirosol.  
Fonte: VASCONCELO *et al.*, 2013.

Como *S. mutans* e *C. albicans* têm sido frequentemente encontrados juntos em biofilmes cariogênicos, (RAJA; HANNAN; ALI, 2010; METWALLI *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2016; HWANG *et al.*, 2015) e o crescimento de biofilme é essencial para a virulência de ambos, fica clara a importância de estudar como essa interação entre espécies de reinos diferentes, interfere na formação, virulência e morfologia do biofilme.

Embora ainda não haja consenso na literatura a respeito da influência da *Candida albicans* no biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans*, acredita-se que essa interação influencie o crescimento, arquitetura, produção de polissacarídeos e formação do biofilme (KIM *et al.*, 2017).

Assim, o foco do presente estudo foi avaliar a influência do sobrenadante de *S. mutans* e de *C. albicans* no biofilme monoespécie e duo-espécie composto por esses microrganismos,

devido à grande importância dos mesmos no desenvolvimento da cárie. Essa influência será estudada através da análise da contagem das unidades formadoras de colônias dos biofilmes formados na presença dos sobrenadantes, avaliação da hidrofobicidade das células, formação de polissacarídeos extracelulares, análise morfológica e estrutural do biofilme por microscopia eletrônica de varredura e do padrão de formação do biofilme por microscopia confocal de varredura a laser.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Streptococcus mutans*

O gênero estreptococos é composto por microrganismos de células esféricas e ovais medindo aproximadamente 0,5 a 0,75  $\mu\text{m}$  de diâmetro, formados por um conjunto heterogêneo de cocos agrupados em cadeias, dividem-se em um único plano (SPOLIDORIO; DUQUE. 2013).

*S. mutans* foi isolado por Clark em 1924, que inicialmente, o chamou de estreptococos mutantes, por suas células serem ovais e diferirem dos outros estreptococos já conhecidos (LEMOS *et al.*, 2013). Porém, somente no final da década de 1950, o *S. mutans* recebeu maior atenção da comunidade científica e, em meados da década de 1960, foi reconhecido como um importante agente etiológico da cárie dentária (LEMOS *et al.*, 2013). Além disso, pesquisas recentes descrevem o *S. mutans* como agravador de endocardite infecciosa, esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e colite ulcerativa (LIU *et al.*, 2017).

O *S. mutans* é considerado um patógeno pandêmico, pois está presente em populações de diversas origens, étnicas, geográficas e socioeconômicas (SPOLIDORIO; DUQUE, 2013). É um microrganismo oportunista, pertencente ao filo firmicutes, Gram-positivo, anaeróbio facultativo, a maioria das cepas isoladas é  $\alpha$ -hemolítica ou não-hemolítica e podem ser encontradas em quatro sorotipos: c, e, f e k (SPOLIDORIO; DUQUE, 2013; SZTAJER *et al.*, 2014).

Embora diversos microrganismos façam parte do biofilme cariogênico, o *S. mutans* continua sendo o microrganismo mais estudado relacionado ao assunto (WASSEL *et al.*, 2017) e apesar da disponibilidade de opções profiláticas, a cárie dentária permanece com alta prevalência e persistência na população humana (KEARNS; GLANTZ; SCHMIDT, 2015; YAVAGAL; SINGLA, 2017). Estima-se que a 60-90% de crianças em idade escolar e grande parte da população adulta mundial possua lesões cáries (ALJANAKH, 2017). Por ser uma doença de difícil controle e tratamento, aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas no mundo vivem com a doença em dentição permanente e 61 milhões de crianças mostram a mesma manifestação na dentição decídua (KASSEBAUM *et al.*, 2015).

A dificuldade em controlar a doença pode ser devida aos diversos fatores relacionados à sua etiologia, como por exemplo: idade, dieta, higiene bucal, condições sistêmicas e imunes, e o uso de certos medicamentos que induzem a hipossalivação (BOWEN *et al.*, 2017). A influência da dieta é um dos fatores mais importantes e pode ser ilustrada em experimentos que expõe o hospedeiro à sacarose e verificam a mudança drástica na microbiologia do biofilme dental (BOWEN *et al.*, 2017).

Dentro do biofilme dentário, o *S. mutans* contribui para a composição da matriz, especialmente através da produção de polissacáridos (KAWADA-MATSUO; OOGAI; KOMATSUZAWA, 2017). A sua patogenicidade é influenciada pela produção de ácidos orgânicos (ácidos láctico, fórmico, acético e propiônico), que por sua vez, induzem a queda do pH e a virulência do biofilme (DÍAZ-GARRIDO; LOZANO; GIACAMAN, 2016). A capacidade de produzir ácidos a partir da fermentação de carboidratos, lhe proporciona uma vantagem competitiva sobre outras bactérias comensais, porém, pouco se sabe sobre como essa produção ácida é influenciada pela presença de outras espécies (GUO *et al.*, 2013).

O ambiente ácido promovido pelo *S. mutans* gera modulações rápidas no pH do biofilme, que podem cair de pH neutro ( $\approx 7,0$ ) para valores ácidos abaixo de 4,0 em menos de 20 minutos (HAMILTON; BUCKLEY, 1991). A capacidade desses microrganismos de suportar ambientes ácidos vem da resposta à tolerância ácida (ATR, do inglês: acid tolerance response), que é definida como a capacidade de se adaptar ao estresse ácido por exposição prévia a um pH baixo ou sub-letal, resultando na indução de um estímulo (expressão de determinados genes de virulência) que aumentam a sobrevivência em um pH tão baixo quanto o pH 3,0 (MATSUI; CVITKOVITCH, 2010). Em paralelo, a acidificação da matriz rica em polissacarídeos (PEC) favorece o crescimento dos microrganismos que são tolerantes ao estresse ácido e promove a desmineralização do esmalte dentário, porém, o papel preciso dos PEC na formação e estrutura de ambientes ácidos nos biofilmes ainda permanece inexplorado (DÍAZ-GARRIDO; LOZANO; GIACAMAN, 2016).

A síntese dos PEC é importante fator de virulência do *S. mutans* (KIM *et al.*, 2017), pois, promove aderência bacteriana à superfície do dente, mesmo em superfícies lisas, contribui para a integridade estrutural dos biofilmes e altera a porosidade do mesmo, facilitando a difusão do açúcar pela matriz, levando a quedas mais acentuadas no pH (CCAHUANA-VASQUEZ; CURY, 2017).

Esses polissacarídeos, principalmente glucanos sintetizados por glucosiltransferases microbianas, são de estrutura complexa, que mudam ao longo do tempo durante o desenvolvimento da matriz extracelular do biofilme (KOO *et al.*, 2010). Os polissacarídeos podem ser classificados em extracelulares solúveis (PECs), com ligações glicosídicas predominantes  $\alpha$ -1-6 e insolúveis (PECi), com ligações predominantes  $\alpha$ -1-3 (GUO *et al.*, 2015).

As glucosiltransferases (GtfB, GtfC e GtfD), que sintetizam o glucano a partir de açúcares da dieta, são codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*, sendo as glucosiltransferases B e C, as mais relevantes quando relacionadas a formação de micro-colônias e polissacarídeos (REN *et al.* 2016). Outra importante proteína neste processo chama-se proteína de superfície com afinidade para o glucano (Gbp) (do inglês: *glucan binding proteins*), as quais contribuem para o crescimento do biofilme de *S. mutans* e, portanto, para a sua virulência (DUQUE *et al.*, 2011). Apesar do papel fundamental das Gtfs e Gbps na virulência de *S. mutans*, os fatores que regulam a expressão dos genes codificadores dessas enzimas ainda não estão bem esclarecidos (STIPP *et al.*, 2008).

Se houver excesso de açúcar disponível, além de produzir ácidos orgânicos e matriz, esse microrganismo é capaz de sintetizar também polissacarídeos intracelulares (PIC), que são polímeros de glicose (tipo glicogênio), que funcionam como uma reserva de carboidratos e diminuem o estresse osmótico, tornando-o ainda mais acidogênico, pois assim, ele é capaz de produzir ácidos até em períodos onde não há disponibilidade de substrato pela dieta, por isso, também são chamados de polissacarídeos de reserva (HARRIS; MICHALEK; CURTISS, 1992; SPATAFORA *et al.*, 1999). Para produzir polissacarídeos extracelulares, o *S. mutans* secreta Gtfs classificadas em três grupos principais: GtfB, GtfC e GtfD (Tabela 1) (REN *et al.* 2016).

Tabela 1. Características das glucosiltransferases do *S. mutans*.

Glucosiltransferase	Função	Referência
GtfB	Sintetiza principalmente glucano insolúvel em água rica em ligações $\alpha$ -1-3	BOWEN <i>et al.</i> , 1980
GtfC	Sintetiza glucanos solúveis e insolúveis em água	BOWEN <i>et al.</i> , 1980
GtfD	Sintetiza glucanos ricos em ligações glicosídicas solúveis em água, ricos em ligações $\alpha$ -1-6	SPOLIDORIO; DUQUE, 2013

As glucosiltransferases desempenham papéis críticos no desenvolvimento de biofilmes dentais mais virulentos e são responsáveis por sintetizar o glucano a partir da sacarose (BOWEN; KOO, 2011). Os glucanos sintetizados proporcionam a adesão bacteriana ao esmalte e a adesão de outros microrganismos, graças a esse processo, são formadas microcolônias que favorecem a construção de um biofilme fortemente unido à superfície dos dentes com ligações estáveis entre as células bacterianas (ZHAO *et al.*, 2014). Cada uma das três Gtfs desempenha um papel diferente e fundamental na formação do biofilme e, portanto, a perda ou mutação de uma delas prejudica todo o processo (KRZYŚCIAK *et al.*, 2014).

Todos os complexos mecanismos citados atribuídos ao *S. mutans* fazem dele um dos principais protagonistas da cárie (HWANG *et al.*, 2015), porém, em meio a grande comunidade diversificada de microrganismos, incluindo bactérias, arqueobactérias, fungos, protozoários e vírus, que fazem parte do microbioma oral (WADE, 2013), o *S. mutans* não poderia agir sozinho dentro do biofilme. Desta forma, outros microrganismos também estão envolvidos na etiologia dessa doença, entre eles, o fungo *C. albicans*, que recentemente tem sido isolado em lesões de cárie (HOSSAIN *et al.*, 2003; JAROSZ *et al.*, 2009; RAJA; HANNAN; ALI, 2010; KRZYŚCIAK *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2017).

## **2.2 *Candida albicans***

Foi Langenback, em 1839, quem pela primeira vez, observou a mais importante levedura patogênica ao homem, hoje conhecida como *Candida albicans* (*C. albicans*), que foi inicialmente observada em aftas bucais de um paciente com tifo. Desde então, essa levedura foi descrita com um número superior a 111 diferentes denominações (SIDRIM; ROCHA, 2004).

O *habitat* de *C. albicans* é bastante amplo, estando ligadas à espécie humana e a todas as espécies de primatas investigadas (SIDRIM; ROCHA, 2004). Fazem parte da microbiota residente do corpo humano, vivem em equilíbrio parasita-hospedeiro, desde que mantida a homeostase tecidual (VIEIRA *et al.*, 2005; DIAZ *et al.*, 2012), no entanto, caso ocorra a quebra dessa homeostase, a *C. albicans* pode se comportar como um agente patogênico causando infecções superficiais e sistêmicas, sendo a candidíase a mais comum (PAPPAS *et al.*, 2016).

*C. albicans* é originária da divisão taxonômica de ascomicetos e é um microrganismo com potencial para causar infecções sistêmicas que ameaçam a vida (SCHMALRECK *et al.*, 2013). Caracterizou-se como uma levedura capaz de formar pseudo-hifas ou hifas. Atualmente, existem sete espécies de *Candida* de importância médica: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* e *C. kefyr*, sendo *C. albicans* o agente causal mais frequente que aflige os seres humanos (CHIN *et al.*, 2016).

Essa capacidade de mudar sua morfologia contribui para a sua patogênese, as hifas são responsáveis pela penetração nos tecidos, enquanto que as leveduras desempenham um papel importante na disseminação precoce e em infecções menos invasivas (SAVILLE *et al.*, 2003).

Além de ser um microrganismo polimórfico, a *C. albicans* continua a ser a espécie de fungos mais comumente associada à formação de biofilmes (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011), por possuir a capacidade de produzir polissacarídeos, na grande maioria do tipo:  $\beta$ -1,3-glucanos (MORALES *et al.*, 2013; GULATI; NOBILE, 2016).

A formação de biofilmes de *C. albicans* inicia-se com a ligação de células de levedura livres a uma superfície, devido à sua elevada hidrofobicidade superficial, suas células são capazes colonizar tanto superfícies duras como mucosas (RAUT *et al.*, 2017).

A medida que o biofilme amadurece, as células sofrem transição morfológica para criar a matriz extracelular (MARTINS *et al.*, 2010). O acúmulo dessa matriz resulta em aumento da resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro (HOSSEINI *et al.*, 2016; SANDAI *et al.*, 2016).

Os estágios de formação do biofilme são: adesão mediada por proteínas de parede celular a uma superfície, crescimento das células de levedura anexadas a uma superfície, maturação do biofilme através do desenvolvimento de pseudo-hifas, hifas e excreção de material de matriz extracelular, dispersão de células de levedura do biofilme, levando a colonização de lugares distantes (Figura 2) (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013).

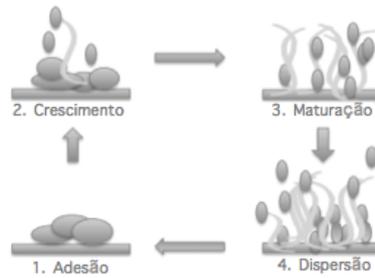


Figura 2. Desenho esquemático da formação do biofilme de *C. albicans*. Fonte: autor.

A patogênese da *C. albicans* é predominantemente devido a genes específicos que permitem que as células fúngicas colonizem o hospedeiro e causem doenças que afetam a pele, o trato gastrointestinal, reprodutor e a cavidade oral (PIVA *et al.*, 2011).

A formação de biofilme e a adaptação da atividade metabólica desempenha um papel chave na habilidade da *C. albicans* de colonizar diferentes regiões do corpo humano e sobreviver as interações com o sistema imune do hospedeiro (SELLAM; WHITEWAY, 2016).

Na cavidade oral, a co-adesão de *C. albicans* com bactérias orais é crucial para a sua colonização e persistência no biofilme (KIM *et al.*, 2017). *C. albicans* parece fornecer sítios de adesão e fatores estimulantes de crescimento para as bactérias, estas por sua vez, excretam lactato que podem atuar como uma fonte de carbono para o crescimento de levedura (KIM *et al.*, 2017).

As associações entre fungos e bactérias podem ser cooperativas ou competitivas (FREY-KLETT *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014). Quando o biofilme oferece condições ideais, esses microrganismos podem cooperar para o crescimento de ambos e interagirem através de um mecanismo chamado *quorum sensing* (GREGOIRE *et al.*, 2011; KOO; BOWEN, 2014).

### 2.3 Quorum Sensing

Anteriormente, acreditava-se que as bactérias, ao contrário dos organismos eucariotos, se comportavam de maneira autossuficiente e mantinham um estilo de vida estritamente unicelular, essa percepção está enraizada nos postulados de Robert Koch, que estabeleceu como “critério de ouro” para definir um patógeno bacteriano o uso de culturas puras (LI; TIAN, 2012). No entanto, hoje sabe-se que culturas puras raramente existem em ambientes

naturais e que as bactérias podem se organizar em comunidades e expressarem um tipo de “comunicação” denominado *quorum sensing* (QS) (LI; TIAN, 2012).

Esse mecanismo de comunicação entre microrganismos foi descoberto pela primeira vez em populações da bactéria marinha *Vibrio fischeri*, posteriormente, foi evidenciado que esse mecanismo coordena a expressão gênica e, portanto, o comportamento da comunidade microbiana (WEN; BURNE, 2004). Por muito tempo as práticas e pesquisas microbiológicas se limitaram as análises de "cepas puras", no entanto, desde a descoberta do QS, o estilo de vida e a comunicação estabelecida pelos microrganismos se tornou cada vez mais importante para a compressão das doenças humanas (WOZNIAK; PARSEK, 2014; CLAESSEN *et al.*, 2014).

O QS é a capacidade dos microrganismos de se comunicar e coordenar o comportamento através da secreção de moléculas de sinalização que se acumulam durante o crescimento de uma maneira dependente da densidade populacional (WONGSUK, PUMEESEAT, LUPLERTLOP, 2016). Processos que são controlados por sensores de *quorum*, como a bioluminescência, a secreção de fatores de virulência e a formação de biofilmes, são improdutivos e onerosos quando realizados por uma única célula bacteriana, mas tornam-se efetivos quando realizados por um grupo (BASSLER; LOSICK, 2006).

O mecanismo utilizado para regular diferentes funções entre os microrganismos no biofilme ocorre por meio da produção de moléculas químicas sinalizadoras, também chamadas de autoindutores, presentes no sobrenadante (HE *et al.*, 2016). As células podem interagir através de sinais de QS que estimulam o crescimento populacional do biofilme com um aumento adicional das moléculas de sinalização (DONG; ZHANG, 2005).

As moléculas autoindutoras bacterianas podem ser agrupadas em três grupos: autoindutor tipo 1 (AI-1) que são mais comuns em bactérias Gram-negativas, com estrutura química formada de N-acil homoserina lactona (AHL), autoindutor tipo 2 (AI-2), um furanosil borato diéster, serve como um sinal universal para a comunicação intra e interespecies (TALAGRAND-REBOUL; JUMAS-BILAK; LAMY, 2017) e por último temos os oligopeptídeos, produzidos por bactérias Gram-positivas na comunicação intraespécie (SUN *et al.*, 2004).

Na bactéria *S. mutans*, os olipeptídeos CSP (do inglês: *competence inducing peptide*) e XIP (do inglês: *sigX inducing peptide*), são as moléculas de QS mais estudadas e também conhecidos como reguladores centrais (SHANKER; FEDERLE, 2017).

OCSF controla a transcrição de mutacinas, tolerância ácida, formação de biofilmes e a produção de bacteriocinas que possuem atividade antimicrobiana e conferem ao *S. mutans* vantagens ecológicas no biofilme (KHAN *et al.*, 2016). Já o XIP (do inglês: *SigX-inducing peptide*) é um oligopeptídeo composto por 7 resíduos de aminoácidos que forma um complexo com regulador transcricional ComR para ativar a transcrição do gene *SigX* (antigamente denominado *ComX*), que é considerado como regulador central da competência em *S. mutans*(MASHBURN-WARREN; MORRISON; FEDERLE, 2010).

A ativação de *SigX* resulta na expressão de dezenas de proteínas responsáveis pela introdução e incorporação do DNA estranho em seu genoma (competência genética) (KHAN *et al.*, 2016). Assim os *S. mutans* podem sentir a presença de outros estreptococos pela sinalização do XIP e responder diretamente a esse estímulo produzindo bacteriocinas e matando o competidor, enquanto, ao mesmo tempo, exploram sua informação genética, a tabela 2 apresenta um resumo da atividade dessas moléculas no *S. mutans* (SZTAJER *et al.*, 2014; RECK; TOMASCH; WAGNER-DÖBLER, 2015).

Tabela 2. Mecanismo de ação de moléculas do *quorum sensing* de *S. mutans*.

Microrganismo	Molécula de QS	Atividade na célula
<i>S. mutans</i>	CSP	Transcrição de mutacinas
		Tolerância ácida
		Formação de biofilmes
		Produção de bacteriocinas
	XIP	Competência genética
		Regulador da densidade populacional

Fonte: JINZHE *et al.*, 2017

Na *C. albicans*, foram identificadas moléculas chave de QS, que possuem efeitos antagonistas, o primeiro identificado foi o farnesol, uma molécula que inibe a transição morfológica levedura-hifa, inibindo a enzima amplificadora adenilato ciclase (Cyr1), o farnesol pode induzir a morte celular em algumas espécies fúngicas, como por exemplo: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, e até *C. albicans* sob certas condições (EGBE *et al.*, 2017). Posteriormente, isolou-se o tirosol,

uma molécula de QS que estimula a transação morfológica e formação dos tubos germinativos em leveduras e demonstra uma atividade inibitória contra neutrófilos, a tabela 3 descreve o papel das duas principais moléculas de *quorum sensing* em *C. albicans*(ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; MALLICK; BENNETT, 2013).

O álcool fenetílico, triptofano e a substância autorreguladora morfogênica (MARS) (do inglês: *morphogenic autoregulatory substance*), são outras moléculas de QS de *C. albicans* que possuem o mecanismo de ação ainda incertos (MALLICK; BENNETT, 2013).

Tabela 3. Mecanismo de ação de moléculas do *quorum sensing* de *C. albicans*.

Microrganismo	Molécula de QS	Atividade na célula
<i>C. albicans</i>	Farnesol	Inibe a filamentação
		Inibe a formação de biofilmes
		Atividade antifúngica
		Apoptose Induzida
	Tirosol	Estímulo para formação do tubo germinativo
		Estímulo da filamentação durante os estágios iniciais do biofilme
		Desenvolvimento de biofilme
		Atividade antifúngica

Fonte: WONGSUK, PUMEESEAT, LUPLERTLOP, 2016.

Células microbianas utilizam esse sistema de comunicação para regular a expressão de genes envolvidos em diversos processos na formação, virulência e interação entre os microrganismos que colonizam o biofilme (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

#### 2.4 Relações ecológicas entre *S. mutans* e *C. albicans* na cárie dental

Historicamente existe uma separação entre bacteriologistas e micologistas em pesquisas laboratoriais, porém as bactérias e os fungos coexistem e interagem em diversos sistemas ecológicos, entre eles na ecologia oral(MORALES; HOGAN, 2010).

Estudos recentes sobre a interação entre o reino cruzado, bactéria-fungo (BF), mostram que moléculas de QS bacteriano são capazes de interferir ou apoiar a comunidade fúngica circundante e *vice-versa* (MORALES; HOGAN, 2010; FERNANDES *et al.*, 2016; FELDMAN *et al.*, 2016). Por isso, estudar a ecologia dessas interações na busca de alvos potenciais para um equilíbrio do microbioma oral saudável é de grande importância.

A cárie é uma disbiose, ocasionada por um desequilíbrio no microbioma oral seguido da proliferação de determinados microrganismos patogênicos, os quais dependem da exposição a açúcares da dieta que afetam os tecidos mineralizados dos dentes (FEJERSKOV, 2004). É uma doença reconhecidamente bacteriana e o *S. mutans* é o microrganismo mais pesquisado em relação a este assunto, porém alguns autores estudam a relação entre a espécie do fungo *C. albicans* na instalação e desenvolvimento da doença (RAJA; HANNAN; ALI, 2010; METWALLI *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2016; HWANG *et al.*, 2015; ELLEPOLA *et al.*, 2017).

*C. albicans* é um fungo acidogênico, fermentativo, capaz de metabolizar carboidratos da dieta, possui atividade colagenolítica, hidrofobicidade celular e pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento da cárie dental (NIKAWA *et al.*, 2003).

Uma pesquisa realizada por Haja e Hannan em 2010, com o objetivo de identificar a relação entre *C. albicans* e cárie dental, mostrou que a *C. albicans* está presente em 96% das crianças com lesão de cárie (LC) e 24% das crianças sem LC, levando a crer que existe uma relação entre esses microrganismos.

Ademais, Sen *et al.*, (1997) observaram em estudos *in vitro* que *C. albicans* pode colonizar superfícies de esmalte, dentina e cimento, possui a capacidade de penetrar profundamente em túbulos dentinários e por isso, parece contribuir para a progressão da cárie nessas três superfícies, tanto em crianças como em adultos.

A produção de PEC pela *C. albicans* influencia no aumento da biomassa do biofilme, abrigando um maior número de células de *S. mutans*, além disso, é capaz de provocar a desmineralização (menos severa) do esmalte dental de roedores sozinha e quando associada ao *S. mutans* (mais severa) (FALSETTA *et al.*, 2014).

Ellepola *et al.*, (2017), descrevem que a interação entre bactérias e fungos presentes em biofilmes, pode ocorrer através de moléculas de sinalização extracelulares através do envio de moléculas de sinalização ou através de interações físicas intercelulares que apoiam a formação e desenvolvimento de biofilmes cariogênicos que contribuem para a progressão da lesão de cárie.

Hwang *et al.*, (2017), descrevem que moléculas extracelulares (Gtfs) produzidas pelo *S. mutans* são capazes de interagir com a *C. albicans* e estimular a produção de PEC, que proporcionam sítios de colonização para as bactérias, essa interação se baseia em uma

ligação bioquímica mediada por uma exoenzima bacteriana e difere de outras interações BF, como por exemplo, *S. gordonii* e *C. albicans*, que se baseia na ligação célula a célula, através da ligação receptor ligante.

Não existe consenso na literatura sobre a interação *C. albicans*-*S. mutans*, alguns autores a descrevem como antagônica, como CAO *et al.*, (2017), que em estudos *in vitro* demonstraram que o farnesol, inibe na formação do biofilme de *S. mutans*, reduz a expressão dos genes de virulência *luxS*, *brpA*, *ffh*, *recA*, *nth* e *smx* e inibe o desenvolvimento da cárie.

Outro trabalho que demonstrou a ação antagônica de moléculas de QS extracelulares de *C. albicans* contra biofilmes de *S. mutans* foi Arias *et al.*, (2016), que em seus experimentos descreveram a atividade antibacteriana do tirosol sobre o biofilme de 48 horas de *S. mutans*.

Essas moléculas de *quorum sensing* presentes no sobrenadante dos microrganismos tem despertado interesse da comunidade científica, por serem responsáveis pela regulação dos mecanismos de virulência e formação dos biofilmes, em especial, dos biofilmes patogênicos. O *S. mutans* e a *C. albicans* são microrganismos amplamente estudados de forma isolada, porém, ainda pouco explorados juntos. Dada à importância desses microrganismos no biofilme cariogênico, é de grande interesse analisar como esses patógenos se comportam e como isso pode afetar na formação e virulência do biofilme.

### **3 PERGUNTA DE PARTIDA**

Qual a influência do sobrenadante de *S. mutans* e/ou *C. albicans* em biofilmes mono e duo-espécie desses microrganismos?

#### **4 HIPÓTESE**

A presença do sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans* são capazes de modificar a composição e alterar a morfologia do biofilme mono e duo-espécie.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Geral

Avaliar a ação dos sobrenadantes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na formação do biofilme mono e duo-espécie desses microrganismos.

### 5.2 Objetivos específicos

Avaliar a hidrofobicidade das células de *S. mutans* e *C. albicans* na presença dos sobrenadantes.

Avaliar os efeitos dos sobrenadantes de *S. mutans* e *C. albicans* crescidos *in vitro*, na contagem das unidades formadoras de colônia nos biofilmes mono e duo-espécie desses microrganismos.

Avaliar a produção da matriz de polissacarídeos extracelulares solúveis (PECs) e insolúveis (PECi) em biofilme mono e duo-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans*, em contato com os sobrenadantes, utilizando o método colorimétrico.

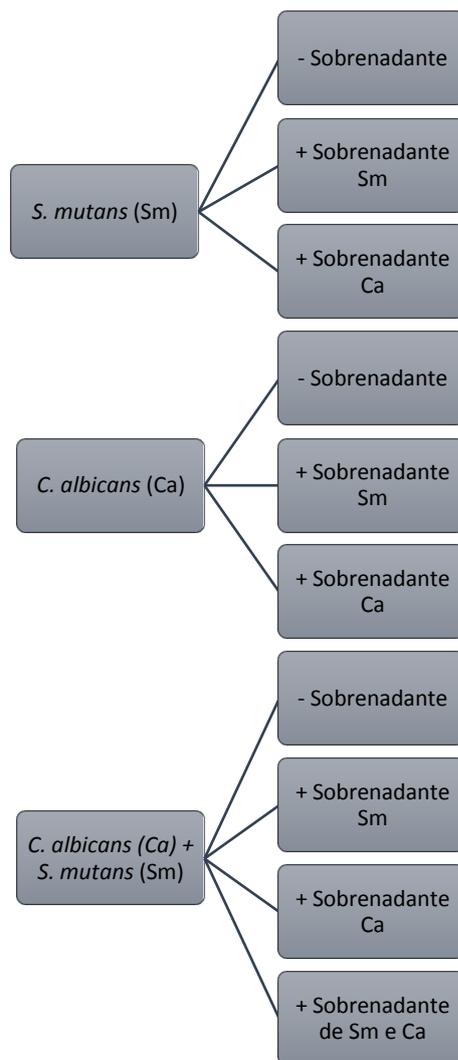
Analisar a morfologia e padrão de crescimento dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Delineamento experimental

Os biofilmes mono-espécie de *S. mutans* e *C. albicans* ou duo-espécie desses microrganismos foram crescidos sobre discos de hidroxiapatita (HA) estéreis (D = 9,27 mm), com ou sem sobrenadante, alocados em placas de 24 poços, e acondicionados em estufa de CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em momentos distintos. A divisão dos grupos experimentais está exposta no fluxograma 1.

Fluxograma 1. Grupos e condições experimentais



## 6.2 Estirpes microbianas e condições de crescimento

Foram utilizadas cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 10231) e *Streptococcus mutans* (ATCC 700610/UA 159) mantidas em freezer a - 80 °C do LEBIM – Laboratório de Ensaios em Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Para ativação desses microrganismos, a cepa de *C. albicans* foi cultivada em caldo YNB(BD Becton, Dickinson e Company, EUA) suplementado com 5% de dextrose (Difco, Detroit, MI, EUA) e a cepa de *S. mutans* foi cultivada em caldo BHI (Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com extrato de levedura (EL) e glicose a 1%. Ambos por 18 h a 37 °C em microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) (SZTAJER *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2016).

As culturas foram diluídas para obter concentração de 10<sup>8</sup>UFC/mL, padronizada comparando a turbidez do inóculo com o padrão 0,5 da escala de MacFarland.

## 6.3 Preparo do sobrenadante

Para obtenção do sobrenadante de:

### *Candida albicans*

As células padronizadas em 10<sup>8</sup> UFC/mL foram incubadas em meio YNB(BD Becton, Dickinson e Company, EUA) suplementado com 5% de dextrose (Difco, Detroit, MI, EUA) a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> pelo período de 2 horas, em seguida, centrifugadas (180 g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi filtrado duas vezes em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA) (SANTOS *et al.*, 2002).

### *Streptococcus mutans*

As células padronizadas em 10<sup>8</sup> UFC/mL foram incubadas em meio BHI (Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com EL (KASVI, PR, BRASIL) e sacarose a 10% por 4h a 37°C em microaerofilia. Após este período, o caldo foi centrifugado (180 g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi filtrado duas vezes (figura 3) em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA) (BARBOSA *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016).

Os sobrenadantes foram plaqueados e incubados a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> durante 48 h para o controle de esterilidade dos mesmos.

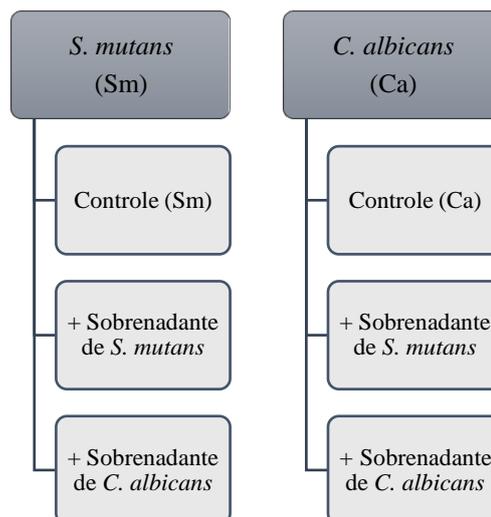


Figura 3. Obtenção do sobrenadante.  
Fonte: Autor.

#### 6.4 Ensaio de hidrofobicidade relativa da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular do *S. mutans* e *C. albicans* foi medida de acordo com o teste de adesão microbiana ao hidrocarboneto (SCHNEIDER; RILEY 1991), com algumas modificações.

Células de *S. mutans* e *C. albicans*, juntamente com os sobrenadantes, foram distribuídas em grupos experimentais dispostos no fluxograma 2 e incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h.



FluxoGrama 2. Distribuição dos grupos para o ensaio da hidrofobicidade da célula de *S. mutans* e *C. albicans*.

Após este período, todos os grupos foram centrifugados a 320 g, para sedimentar as células, estas células foram lavadas duas vezes e suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,89%) para leitura da densidade óptica inicial (DO<sub>i</sub>)(SCHNEIDER; RILEY 1991).

Posteriormente, adicionou-se 0,25 mL de tolueno. Os tubos foram agitados uniformemente durante 2 min e em seguida, deixados em repouso em temperatura ambiente durante 10 minutos. A densidade óptica final (DO<sub>f</sub>) foi determinada a 600 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e o índice da hidrofobicidade (IH) foi calculado através da fórmula:

$$IH = \frac{D_i - D_f}{D_i} \times 100$$

Figura 4. Equação para determinação do Índice de Hidrofobicidade Superficial Celular em células crescidas em contato com os sobrenadantes testados.

### 6.5 Disposição dos grupos experimentais

Inicialmente, foram distribuídos os discos de HA estéreis nas placas de 24 poços, em seguida, distribuído o meio de cultura RPMI(Sigma-Aldrich, Missouri, USA), o sobrenadante e por último o inóculo a  $10^8$  de *S. mutans* e *C. albicans*. As placas foram incubadas por 24 h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, após esse período, cada poço foi lavado com NaCl 0,89% para remoção das células fracamente aderidas, o volume de 2 mL de RPMI (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)foi adicionado aos poços e a placa foi novamente incubada por 24 h (figura 4). Um resumo do delineamento experimental encontra-se no fluxograma 3.

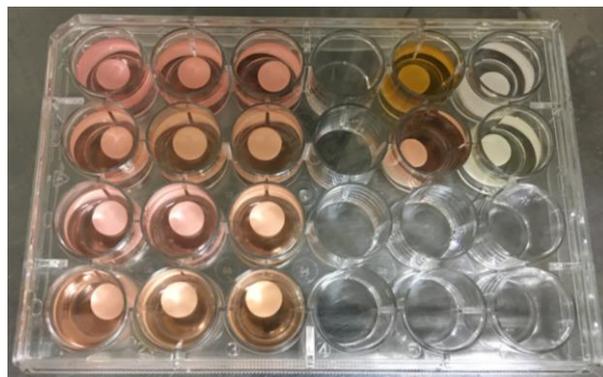
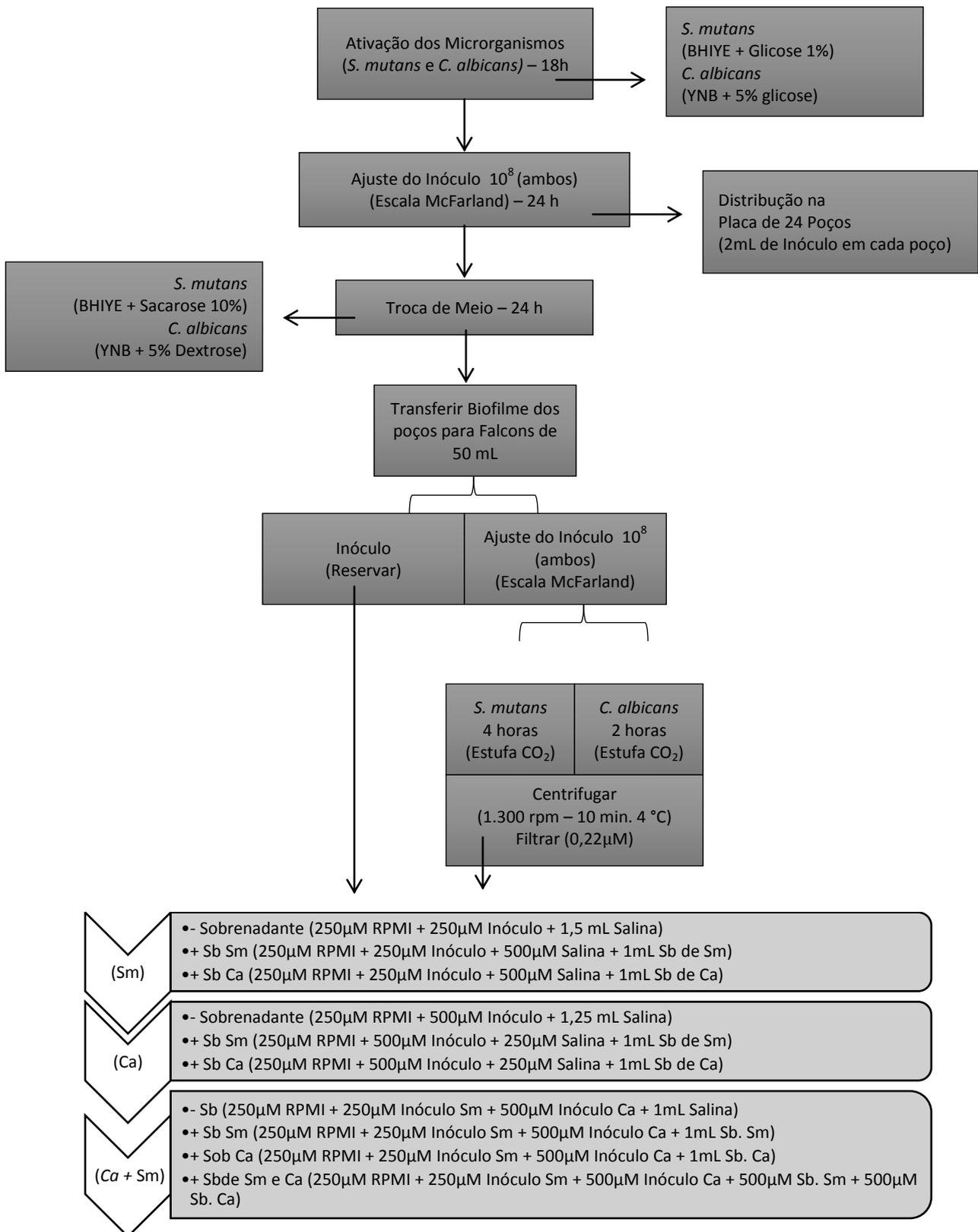


Figura 5. Disposição dos grupos experimentais em placa de 24 poços. Fonte: Autor.



## 6.6 Mensuração do pH

Para avaliar a influência da adição dos sobrenadantes no pH do meio de cultura na qual os biofilmes foram crescidos, o pH de todos os grupos foi mensurado três vezes, em triplicata, utilizando um pHmetro. A medição foi realizada distribuindo os grupos de acordo com o delineamento experimental, 10 minutos após a distribuição na placa de 24 poços (Figura 5) (TECNAL, modelo TEC-3MP).



Figura 6. pHmetro TEC-MP.  
Fonte: Autor.

## 6.7 Coleta do biofilme

Ao final de 48 h de crescimento, os biofilmes formados sobre os discos de HA foram coletados com espátula 3S estéril (uma para cada disco), e transferidos para tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,89%), em seguida, os biofilmes foram sonicados em sonicador de alta potência (Digital Sonifer 450. Branson Ultrasonics Corporation 50/60Hz, 4A) durante 45 s, com intervalos de 15 s, sob refrigeração, com a finalidade de obter suspensões contendo células simples. Em seguida, a suspensão foi diluída em série (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1.000.000 e 1:10.000.000) e semeadas em placas de ágar MSB (*Mitis Salivarius* acrescido de bacitracina e telurito de potássio) e ágar Sabouraud Dextrose, para crescimento de *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> para MSB e bacteriológica para ágar Sabouraud, por 48 h. Após a incubação, a viabilidade celular bacteriana foi mensurada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), e os valores finais foram expressos em (UFC/mL/mg) (peso seco descrito abaixo).

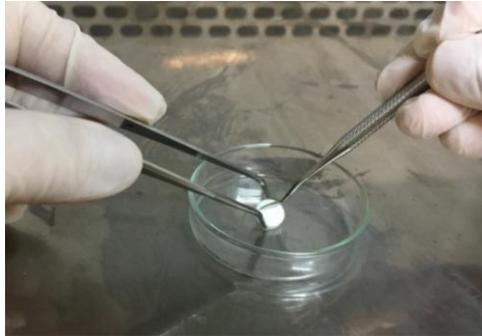


Figura 7. Coleta do biofilme sobre discos de hidroxiapatita.

### **6.8 Análise do peso seco do biofilme**

Para determinar o peso seco do biofilme, três volumes de etanol PA frio (-20°C) foram adicionados a 200 µL da suspensão do biofilme previamente coletado. Em seguida, as suspensões foram vortexadas e centrifugadas (118 g durante 10 min a 4 °C), o sobrenadante foi descartado e 500 µL de álcool a 70% foram adicionados. A nova suspensão foi homogeneizada em vortex e colocada em centrífuga por 5 min em 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado. Sequencialmente, os eppendorfs contendo os precipitados foram armazenados em uma dissecadora e, após 72 h, foram pesados em balança com precisão de cinco casas decimais (modelo: Auw220D; Shimadzu, Tóquio/Japão) (XIAO *et al.*, 2007).

### **6.9 Extração dos polissacarídeos**

Para extração dos polissacarídeos foi utilizada a metodologia descrita por Lins de Sousa *et al.*(2015) modificada. Após 48h de crescimento, os biofilmes formados foram raspados dos discos de HA e coletados em tubos falcons de 50 mL contendo 5 mL de solução salina 0,89%, lavados e centrifugados com intervalos de sonicação para a separação de células bacterianas, o sobrenadante foi coletado, adicionado álcool PA e armazenado a - 20 °C pelo período mínimo de 18 h, enquanto o precipitado suspenso em 2 mL de água ultrapura. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. O sobrenadante foi utilizado para a análise de polissacarídeo extracelular solúvel pelo método do ácido fenil-sulfúrico de Dubois *et al.*, 1956.

O precipitado foi utilizado para a extração dos polissacarídeos insolúveis em água e solúveis em álcali, para isso, foi utilizado NaOH 1 N (1% de peso seco de biofilme/0,3 mL de NaOH 1 N). Inicialmente, 950  $\mu$ L sobrenadante recolhido anteriormente, foi centrifugado e o precipitado foi ressuspensão em NaOH 1N. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. A quantidade total de carboidratos também foi determinada pelo método do ácido fenol-ácido sulfúrico (LINS DE SOUSA *et al.*, 2015; DUBOIS *et al.*, 1956).

Para normalização dos dados, foi preparada a curva padrão da glicose (figura 5), segundo o protocolo proposto por Dubois *et al.*(1956). As concentrações utilizadas foram: 0,0025%, 0,0050%, 0,0075%, 0,01% e 0,012%.

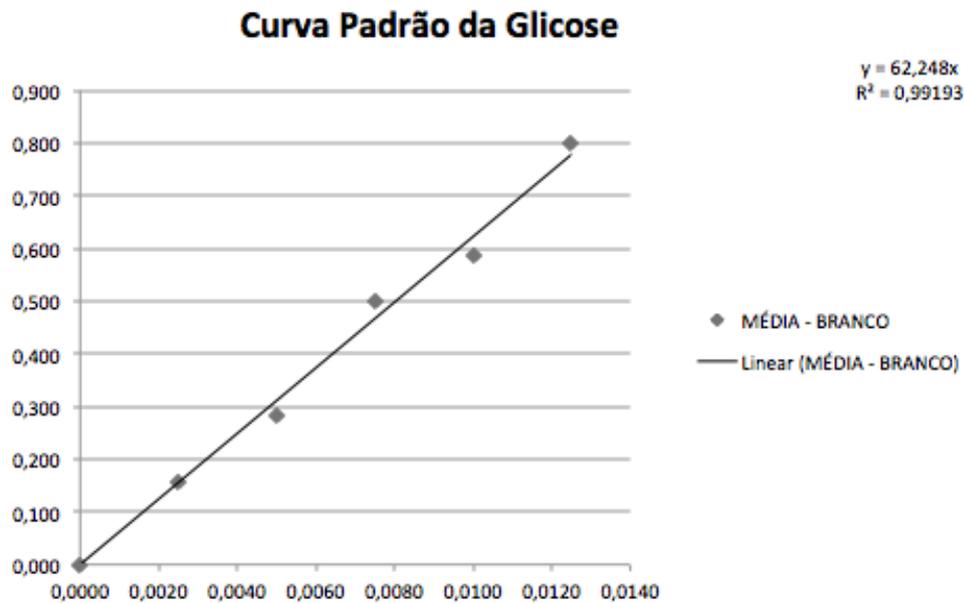


Figura 8. Curva padrão da glicose

## 6.10 Análise morfológica e estrutural dos biofilmes

### 6.10.1 Microscopia eletrônica de varredura

O preparo da amostra foi desenvolvido segundo Weber *et al.*(2014);Bodelón *et al.* (2016), com algumas modificações.

O biofilme foi fixado com glutaraldeído a 2% com tampão de cacodilato 0,1 M (pH 7,4) durante 2 h a 4°C. As amostras foram desidratadas com uma série de concentrações crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 80% e 95% durante 30 min, e acetona absoluta durante 1 h. Em seguida, as amostras foram montadas em discos de alumínio (STUB), coladas com fita adesiva de carbono dupla face, revestida com uma camada de ouro (20 nm) e posicionadas na porta amostra (figura 6). A análise foi realizada com o microscópio eletrônico de varredura Inspect S50 (FEI - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). As imagens foram geradas em três níveis de ampliação 2.000x, 5.000x e 10.000x.

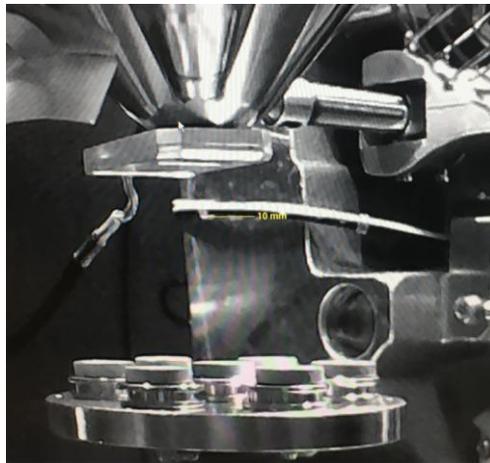


Figura 9. Porta amostra do microscópio varredura Inspect S50 (FEI - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Fonte: Própria.

#### 6.10.2 Microscopia Confocal

Os discos de HA com biofilmes crescidos foram imersos no corante de fluorescência LIVE/DEAD (Invitrogen, CA, EUA), preparado segundo a instrução do fabricante e então avaliados em Microscópio Confocal Nikon C2, a 488 nm para detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis em verde e a 561 nm para detecção do iodeto de propídeo que identifica células com danos na membrana em vermelho. Para análise, cinco pontos equidistantes foram selecionados nas imagens tridimensionais e analisadas no software ImageJ 1.50 (COLLINS, 2007; HE *et al.*, 2012).

### **6.11 Análise estatística**

Os dados foram expressos em forma de média e desvio-padrão e comparados por meio do teste t de Student ou ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5,0 adotando uma confiança de 95% para todas as análises.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Ensaio da hidrofobicidade das células

As cepas de *S. mutans* e *C. albicans* foram testadas quanto à sua hidrofobicidade relativa na presença e ausência do sobrenadante.

Para *S. mutans*:

Na presença do sobrenadante de *C. albicans*, o *S. mutans* apresentou um aumento em 6,8 vezes da sua hidrofobicidade, já na presença do sobrenadante de *S. mutans* a hidrofobicidade aumentou 2,7 vezes em relação ao controle sem sobrenadante (Figura 10).

Para *C. albicans*:

Na presença de seu próprio sobrenadante a hidrofobicidade relativa das células aumentou 1,2 vezes e na presença do sobrenadante de *S. mutans* houve redução da hidrofobicidade (0,01) (Figura 10).

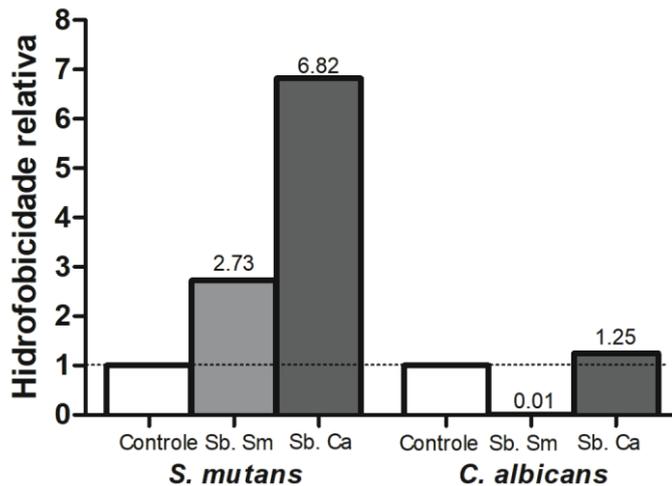


Figura 10. Hidrofobicidade relativa das células de *S. mutans* e *C. albicans* com e sem sobrenadantes.

## 7.2 Interações entre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* no biofilme mono e duo-espécie

### 7.2.1 Efeito do sobrenadante de *Streptococcus mutans* ou de *Candida albicans* sobre a contagem dasUFCnos biofilmes monoespécies de *Streptococcus mutans*

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados, ou seja, não houve aumento ou redução das UFC/mL/mg ( $\text{Log}_{10}$ ) de *S. mutans* crescido na ausência e/ou presença do sobrenadante, de *S. mutans* ou de *C. albicans* (Figura 11).

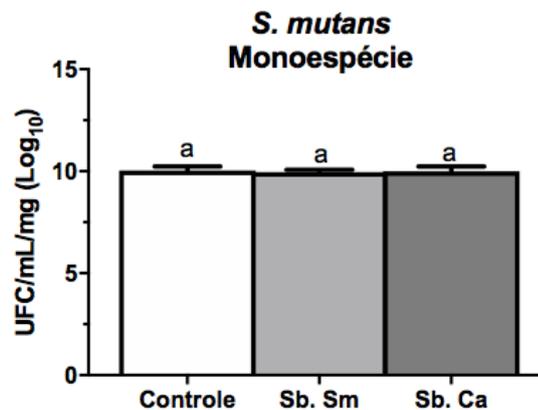


Figura11. Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos na formação de biofilme monoespécie *in vitro* formado por *S. mutans* sozinho (Controle) quando em contato com os sobrenadantes (Sb) de *S. mutans*(Sb. Sm) ou *C. albicans*(Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças.

### 7.2.2 Efeito do sobrenadante de *Streptococcus mutans* ou de *Candida albicans* sobre a contagem dasUFC dos biofilmes monoespécies de *C. albicans*

Os dados mostraram que houve aumento estatisticamente significativo ( $p=0,0487$ ) das UFC/mL/mg de *C. albicans* quando crescida em contato com o sobrenadante de *S. mutans*(Figura 12). Quando cultivada com seu próprio sobrenadante, não apresentou diferenças significativas ( $p>0,9999$ ).

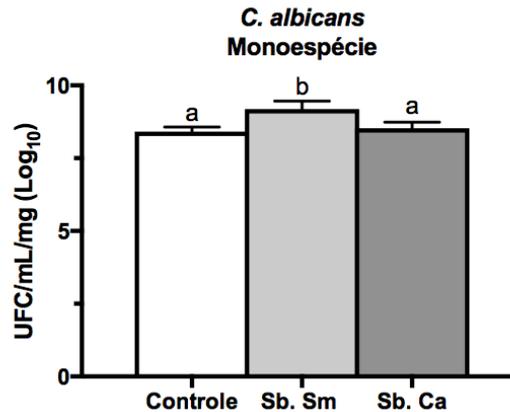


Figura12. Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg (Log<sub>10</sub>) obtidos na formação de biofilme monoespécie *in vitro* formado por *C. albicans* cultivada de forma isolada (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans* (Sb. Sm) ou de *C. albicans* (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças.

### 7.2.3 Efeito do sobrenadante de *Streptococcus mutans* e/ou de *Candida albicans* no biofilme duo-espécie sobre a contagem das UFC de *S. mutans* - UFC/mL/mg

Foi analisado o efeito dos sobrenadantes sobre a biomassa do biofilme de *S. mutans* semeado em ágar MSB. Segundo os dados, houve redução estatisticamente significativa ( $p=0,0454$ ) na contagem de UFC de *S. mutans* no biofilme duo-espécie na presença do sobrenadante de *C. albicans* quando comparado ao controle. O grupo crescido com ambos os sobrenadantes não diferiu do grupo controle, entretanto, foi observado diferenças significantes ( $p=0,0165$ ) neste grupo quando comparado ao grupo crescido na presença de sobrenadante de *S. mutans* ( $p=0,0165$ ) (Figura 13).

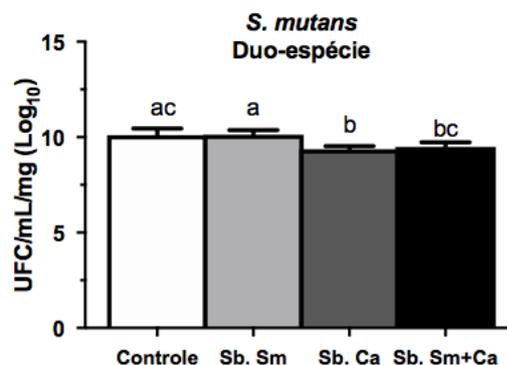


Figura13. Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg (Log<sub>10</sub>) de *S. mutans* no biofilme duo-espécie *in vitro* formado por *S. mutans* e *C. albicans* (Controle), quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans* (Sb. Sm) e com o sobrenadante de *C. albicans* (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças.

#### 7.2.4 Efeito do sobrenadante de *Streptococcus mutans* e/ou de *C. albicans* no biofilme duo-espécie sobre a contagem das UFC do biofilme de *C. albicans*

Para verificar a contagem da *C. albicans* no biofilme duo-espécie, os grupos foram semeados em ágar Sabouraud. Os resultados mostraram que não houve diferenças estatísticas na viabilidade do biofilme duo-espécie crescido com e sem os sobrenadantes (Figura 14).

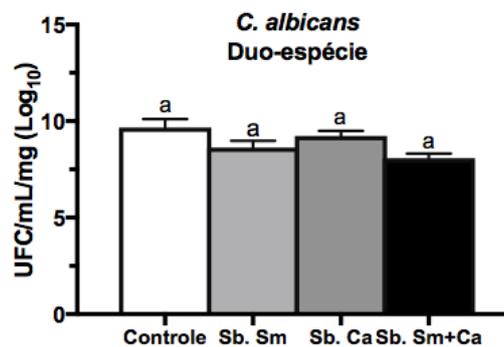


Figura 14. Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL/mg (Log<sub>10</sub>) de *C. albicans* no biofilme duo-espécie *in vitro* formado por *S. mutans* e *C. albicans* (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans* (Sb. Sm) e *C. albicans* (Sb. Ca). Letras diferentes denotam diferenças.

### 7.3 Mensuração do pH

Os valores de pH dos grupos testados, tanto do biofilme mono quanto duo-espécie, foram ácidos (variando de 5,3 a 6,1) conforme aferidos logo após a distribuição dos grupos e antes da análise dos grupos. Os valores de pH dos biofilmes de *S. mutans* (Figura 15a), de *C. albicans* (Figura 15b) e do biofilme duo-espécie (Figura 15c) foram semelhantes, apesar das diferenças na formação de microcolônias e densidades microbianas.

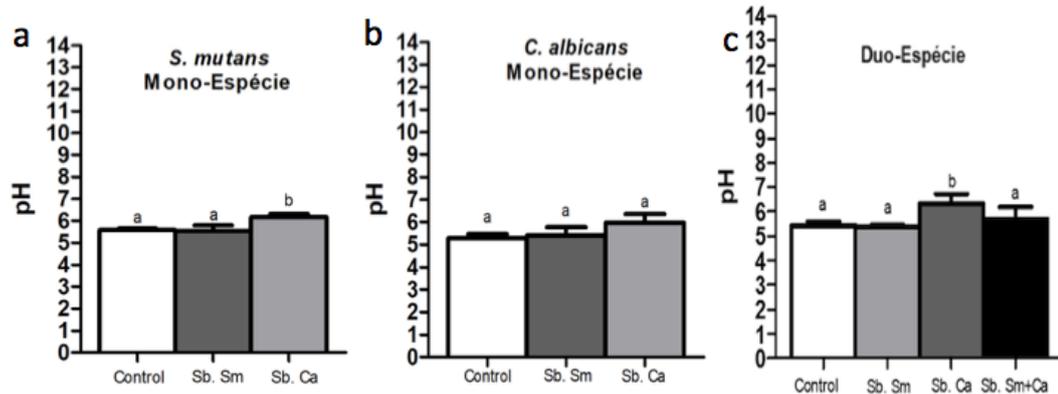


Figura 15. Média e desvio padrão dos valores de pH do biofilme monoespécie formado por *S. mutans*(a), *C. albicans*(b) e pelo biofilme duo-espécie (c) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans*(Sm) e *C. albicans*(Ca).

#### 7.4 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais (PECT)

Os polissacarídeos extracelulares totais foram analisados através da soma dos polissacarídeos extracelulares solúveis e polissacarídeos extracelulares insolúveis. Os resultados estão apresentados abaixo.

7.4.1 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por *S. mutans*

Para análise e quantificação foi utilizado o método de Dubois *et al.*, 1956. Os resultados demonstram que houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0.0001$ ) dos PECT produzidos por *S. mutans* quando em contato com seu próprio sobrenadante e com o sobrenadante de *C. albicans* ( $p = 0,0002$ ) (Figura 16). Quanto a análise dos PECi, não houve diferenças estatísticas no biofilme cultivado com o sobrenadante de *C. albicans* quando comparado ao controle.

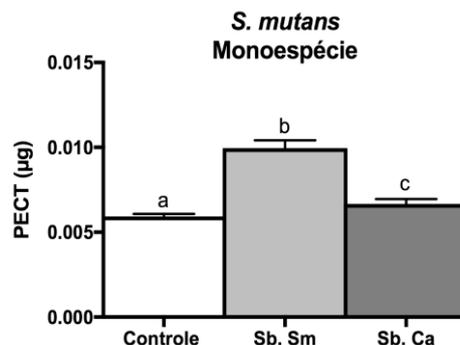


Figura 16. Média e desvio padrão dos valores referentes a análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por *S. mutans*(Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans*(Sm) e *C. albicans* (Ca). Letras diferentes denotam diferença.

7.4.2 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por *C. albicans*.

Houve aumento significativo na produção dos PECT de *C. albicans* quando cultivada em contato com o sobrenadante de *S. mutans* ( $p=0,0025$ ), entretanto, não foi observado diferenças no grupo cultivado com seu próprio sobrenadante, ambos comparados ao grupo controle (Figura 17).

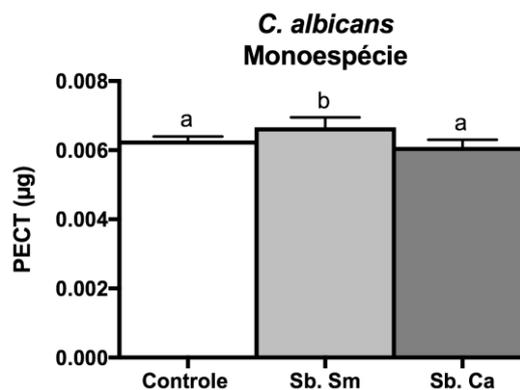


Figura 17. Média e desvio padrão dos valores referentes a análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme monoespécie formado por *C. albicans* (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans* (Sm) e *C. albicans* (Ca). Letras diferentes denotam diferença.

7.4.3 Análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme duo-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans*.

Conforme mostrado no gráfico, houve um aumento significativo ( $p<0.0001$ ) na produção de PECT no biofilme duo-espécie cultivado com sobrenadante de *S. mutans* quando cultivado na presença de ambos os sobrenadantes ( $p<0.0001$ ) (Figura 18).

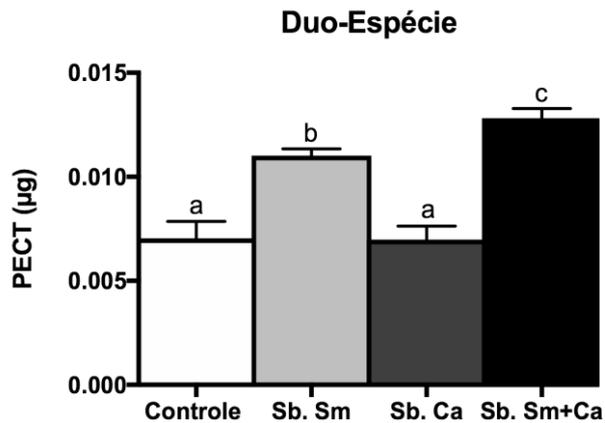


Figura 18. Média e desvio padrão dos valores referentes a análise dos polissacarídeos extracelulares totais no biofilme duo-espécie formado por *S. mutans* e *C. albicans* (Controle) quando em contato com o sobrenadante (Sb) de *S. mutans*(Sm) e *C. albicans* (Ca), juntos e separadamente Letras diferentes denotam diferença.

### 7.5 Efeito do sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans* na morfologia do biofilme mono e duo-espécie por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para o estudo do efeito dos sobrenadantes desses microrganismos na morfologia e topografia do biofilme mono e duo-espécie os grupos experimentais foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

No biofilme monoespécie de *S. mutans* pode-se notar que em contato com os sobrenadantes de *S. mutans* e *C. albicans*, houve aumento de células agrupadas, sugerindo aumento na produção de matriz extracelular (Figuras 19). Entretanto, no biofilme monoespécie formado por *C. albicans*, aparentemente não foram observadas alterações morfológicas do fungo quando em contato com ambos os sobrenadantes(Figura 19).

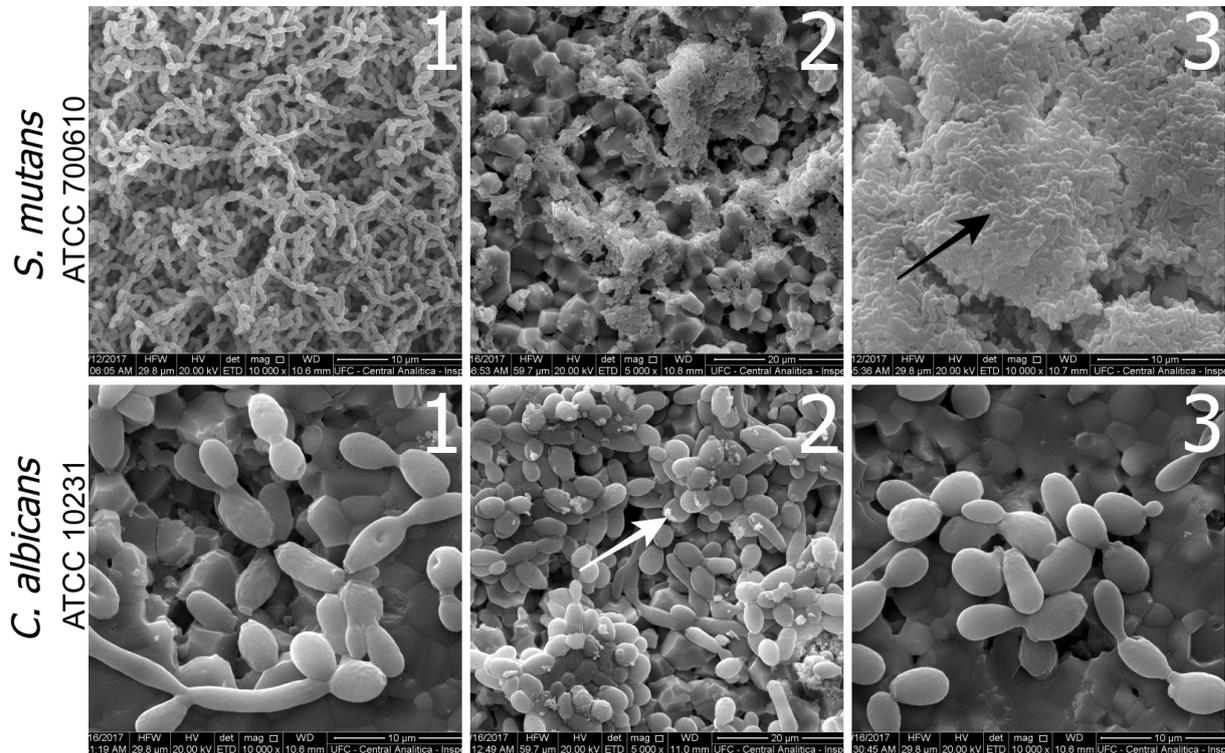


Figura 19. Micrografia eletrônica do biofilme monoespécie de *S. mutans* UA159 (Magnitude: 10.000x – Barra: 10  $\mu\text{m}$ ) e de *C. albicans* ATCC 10231 (Magnitude: 5.000x – Barra: 10  $\mu\text{m}$ ) - 1) grupo controle, 2) grupo crescido com sobrenadante de *S. mutans*, 3) grupo crescido com sobrenadante de *C. albicans*. Seta prata indica grande proximidade entre as células de *S. mutans*. Seta branca indica resquícios de polissacarídeo em biofilme monoespécie de *C. albicans*.

No biofilme duo-espécie pode-se notar que houve aumento da filamentação da *C. albicans* quando em contato com o sobrenadante de *S. mutans*. Quando em contato com seu próprio sobrenadante, ocorre filamentação (figuras 20 e 21).

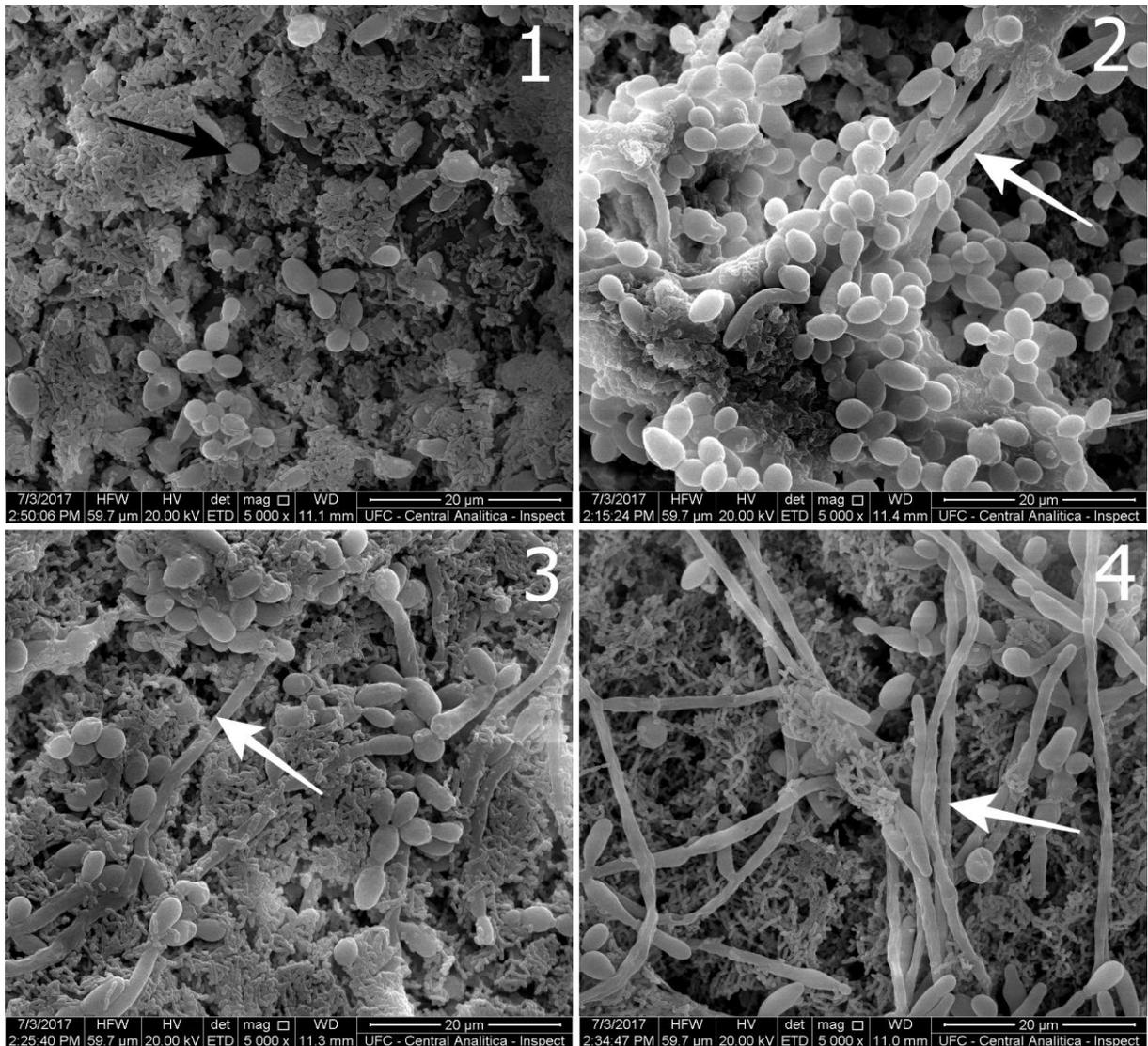


Figura 20. Micrografia eletrônica do: 1) Biofilme duo-espécie sem sobrenadante, 2) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de *S. mutans*, 3) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de *C. albicans*, 4) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans* (Magnitude: 5.000x – Barra: 20 µm). Seta preta indica levedura e setas brancas indicam hifas de *C. albicans*.

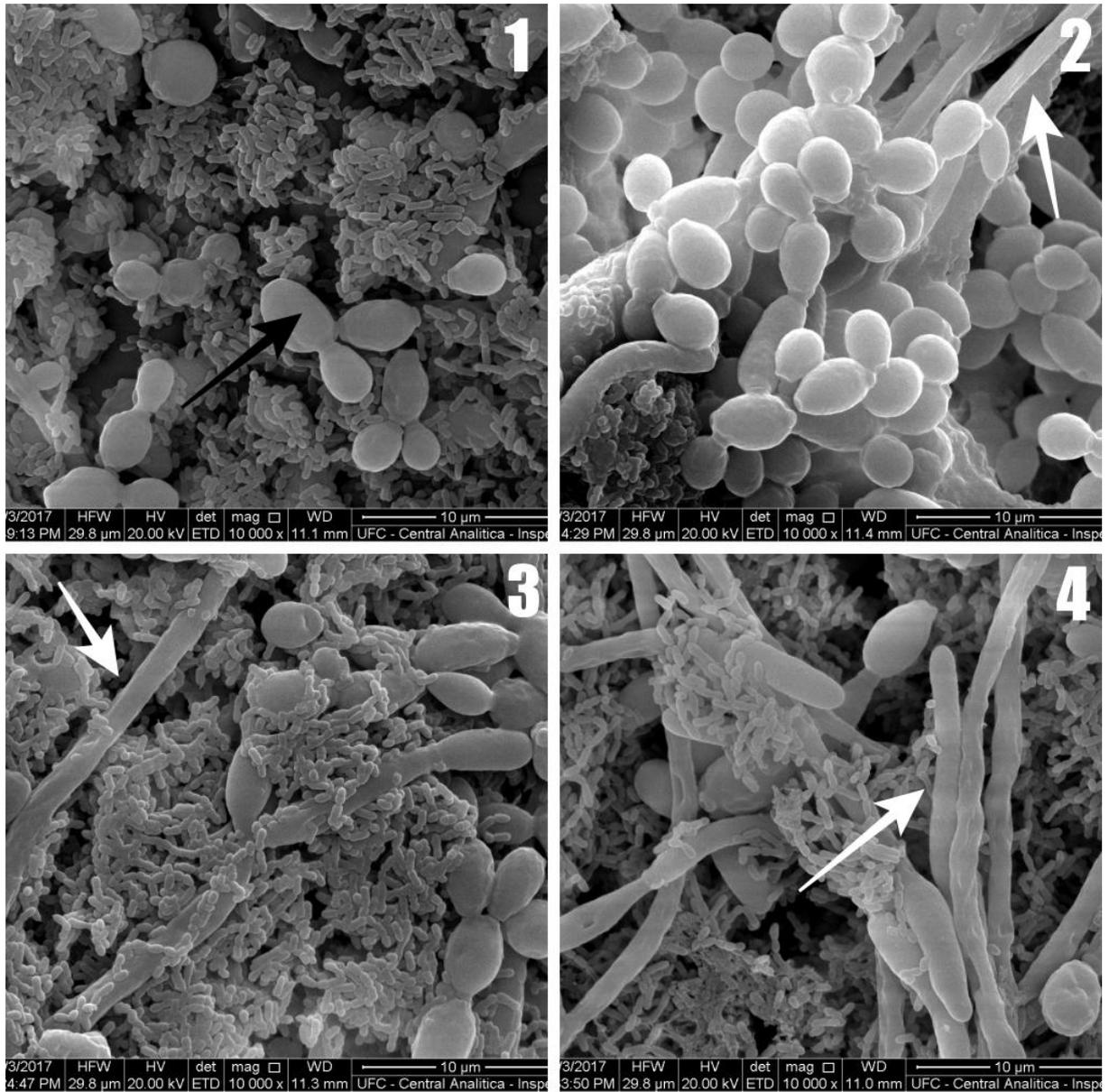


Figura 21. Micrografia eletrônica do: 1) Biofilme duo-espécie sem sobrenadante, 2) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de *S. mutans*, 3) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de *C. albicans*, 4) Biofilme duo-espécie com sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans* (Magnitude: 10.000x – Barra: 10 µm). Seta preta indica levedura e setas brancas indicam hifas de *C. albicans*.

## 7.6 Efeito dos sobrenadantes de *S. mutans* e *C. albicans* sobre o padrão de formação dos biofilmes mono e duo-espécies – Microscopia Confocal a Laser (MCL).

### 7.6.1 Análise topográfica do biofilme

As imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser foram utilizadas para observar o padrão de crescimento dos biofilmes crescido em contato com os sobrenadantes testados. A viabilidade celular foi evidenciada pelos fluoróforos SYTO 9, que cora células com membranda íntegra e iodeto de propídio, que cora células com danos na membrana.

As imagens obtidas no biofilme monoespécie de *S. mutans*, sem os sobrenadantes, aparentemente possuem menor volume da biomassa (Figura 22A), quando comparadas com as imagens obtidas dos grupos tratados com sobrenadantes (Figuras 22B e 22C).

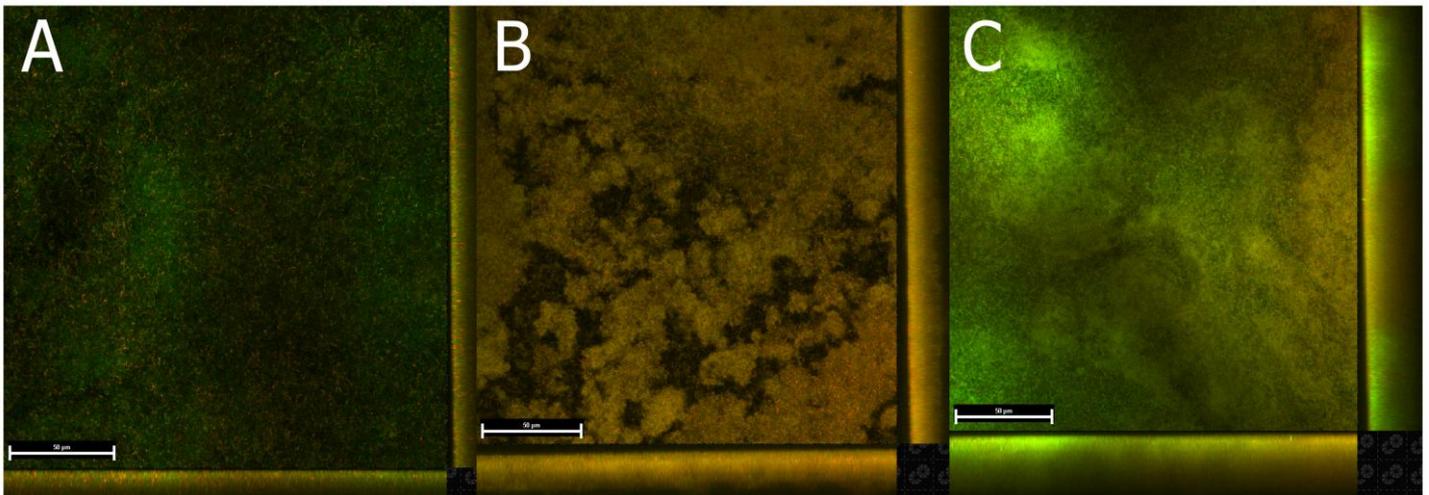


Figura 22. Padrão de formação de biofilme monoespécie de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita, (A) Sem sobrenadante, (B) com sobrenadante de *S. mutans* e (C) com sobrenadante de *C. albicans*.

No biofilme monoespécie de *C. albicans*, aparentemente houve aumento do número de células quando cultivado com seu próprio sobrenadante (Figura 23C). No biofilme duo-espécie, podemos notar a proximidade das células de *S. mutans* com os filamentos da *C. albicans*(Figura 24B).

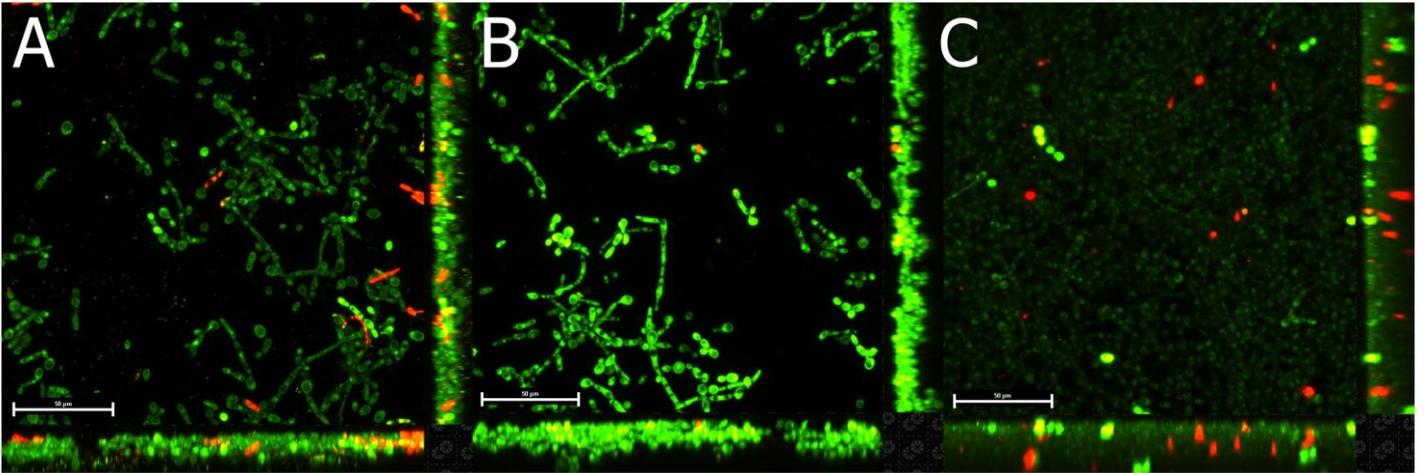


Figura 23. Padrão de formação de biofilme monoespécie de *C. albicans* formado por (A) *C. albicans* (B) *C. albicans* com sobrenadante de *S. mutans* (C) *C. albicans* com sobrenadante de *C. albicans*.

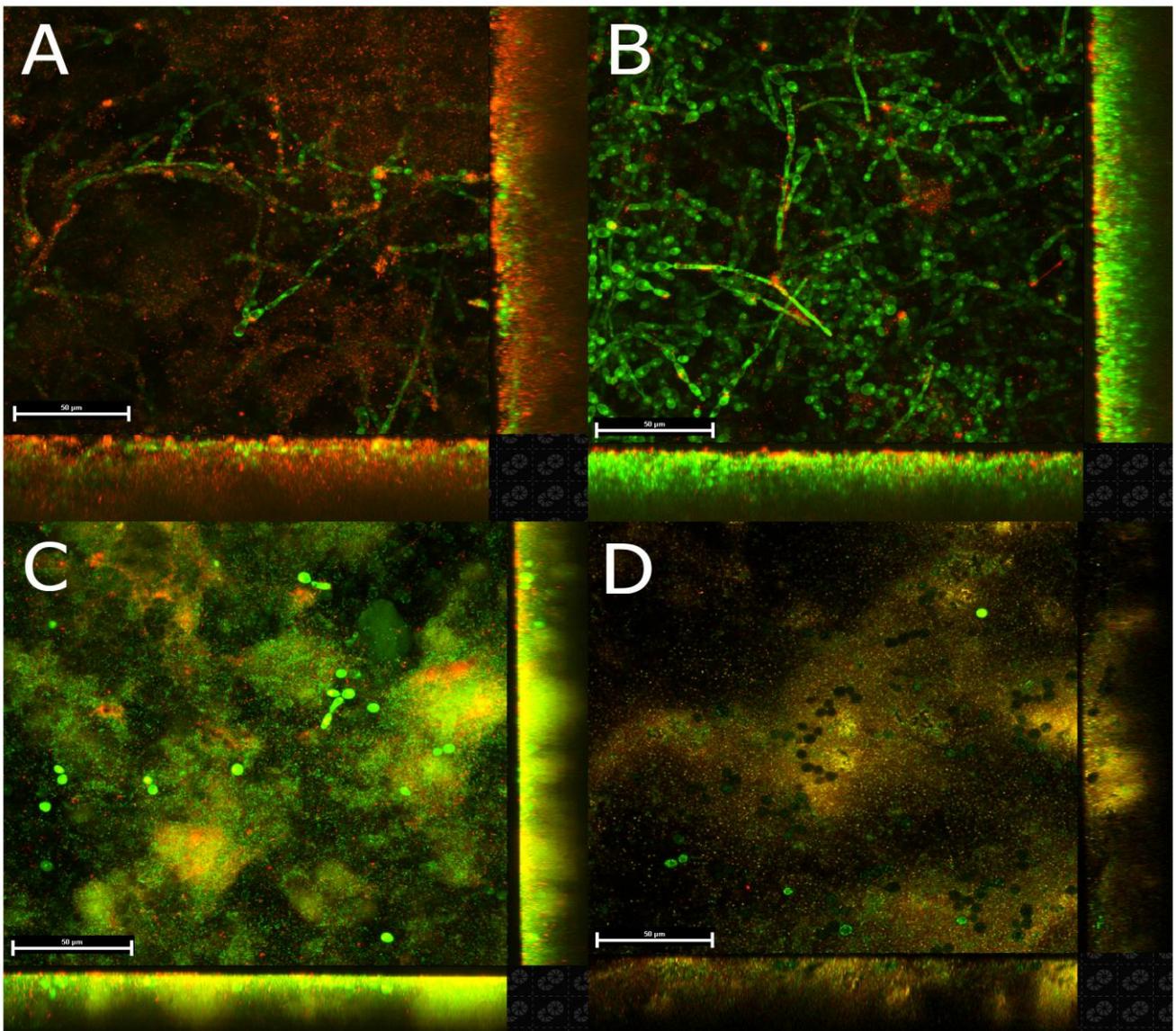


Figura 24. Padrão de formação de biofilme duo-espécie (A) sem sobrenadante, (B) com sobrenadante de *S. mutans* (C) com sobrenadante de *C. albicans* e (D) com ambos os sobrenadantes.

### 7.6.2 Análise 3D da superfície do biofilme

A arquitetura 3D da superfície do biofilme analisada foi obtida através do *software* ImageJ versão 1.50. Pode-se observar que houve aumento da biomassa do biofilme monoespécie de *S. mutans* em contato com seu sobrenadante (Figura 26), quando comparado ao controle (Figura 25) e nota-se que não houve alterações no biofilme em contato com sobrenadante de *C. albicans* (Figura 27).

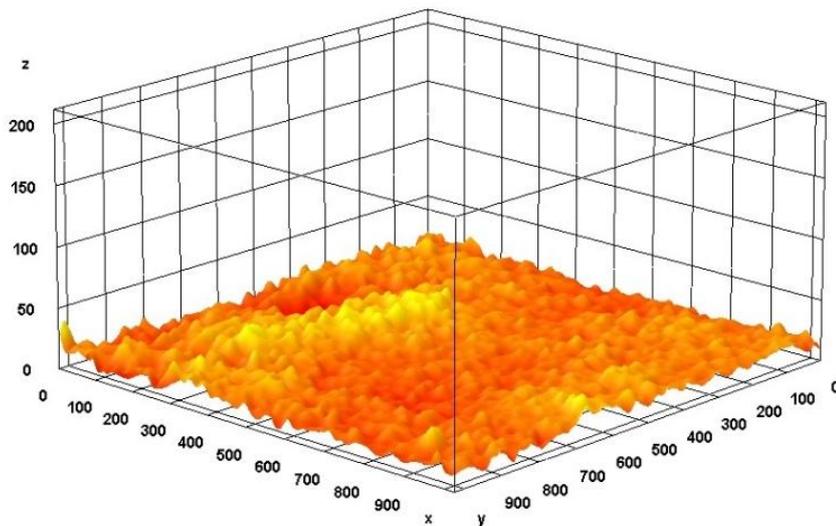


Figura 25. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme monoespécie de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita.

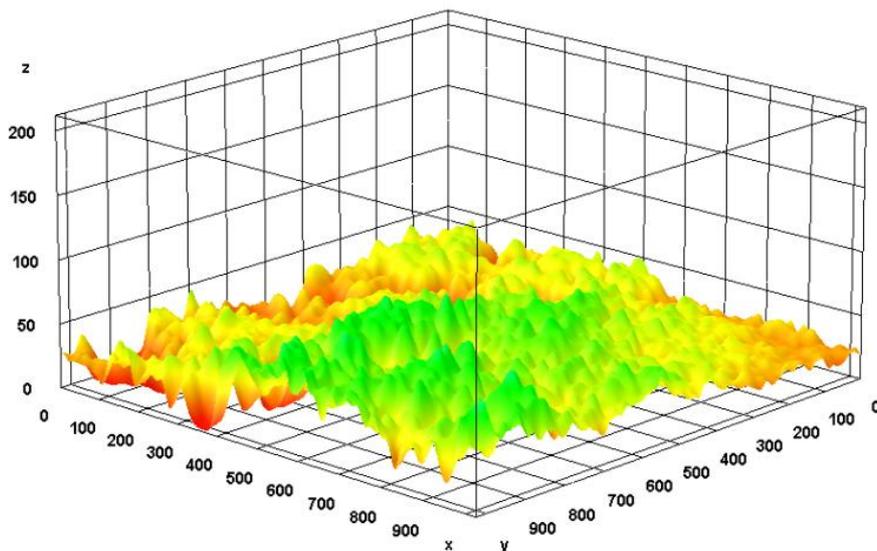


Figura 26. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme monoespécie de *S. mutans* cultivado com o sobrenadante de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita.

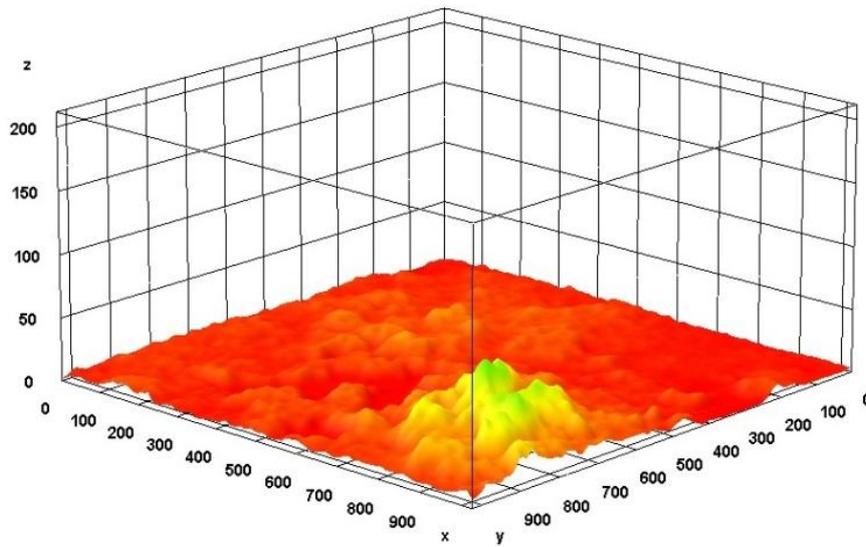


Figura 27. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme monoespécie de *S. mutans* cultivado com o sobrenadante de *C. albicans* sobre discos de hidroxiapatita.

No biofilme monoespécie de *C. albicans*, não foi observado diferenças entre os grupos e condições testadas (Figura 28-30)

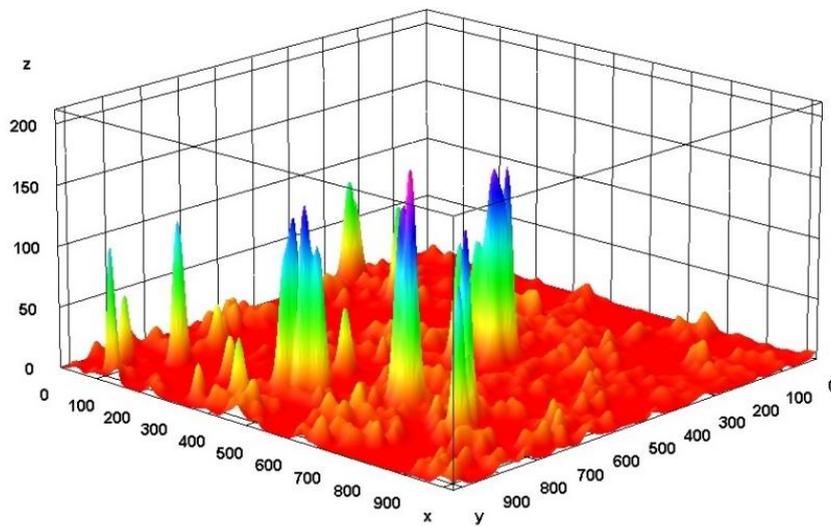


Figura 28. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme de *C. albicans*.

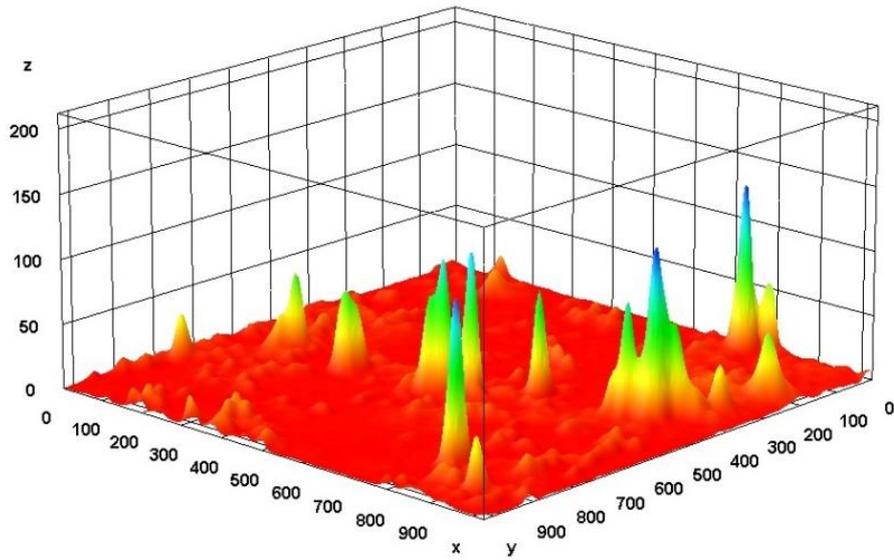


Figura 29. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme de *C. albicans* cultivado com o sobrenadante de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita.

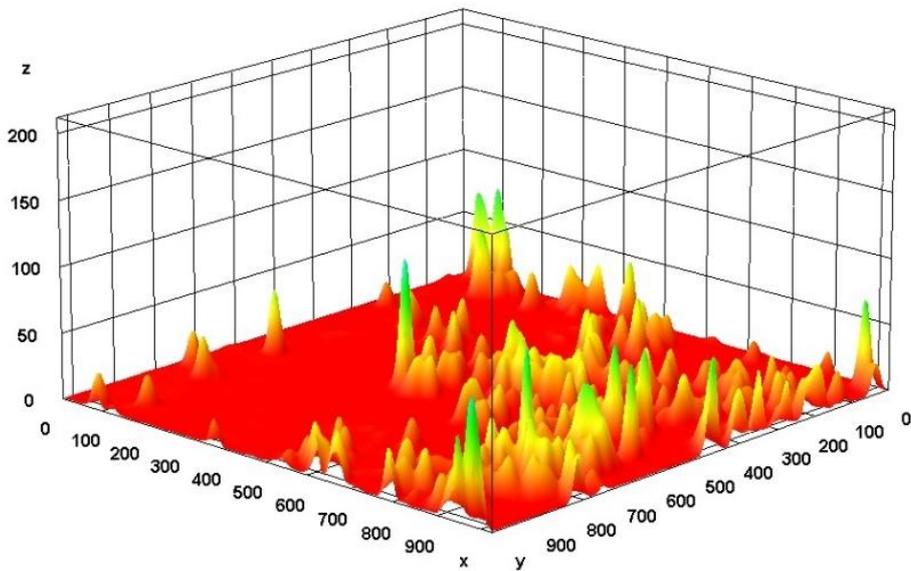


Figura 30. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme de *C. albicans* cultivado com o sobrenadante de *C. albicans*, sobre discos de hidroxiapatita.

Por último, analisou-se a superfície 3D do biofilme duo-espécie, as imagens sugerem que houve aumento da biomassa quando crescido com sobrenadante de *S. mutans* (Figura 32).

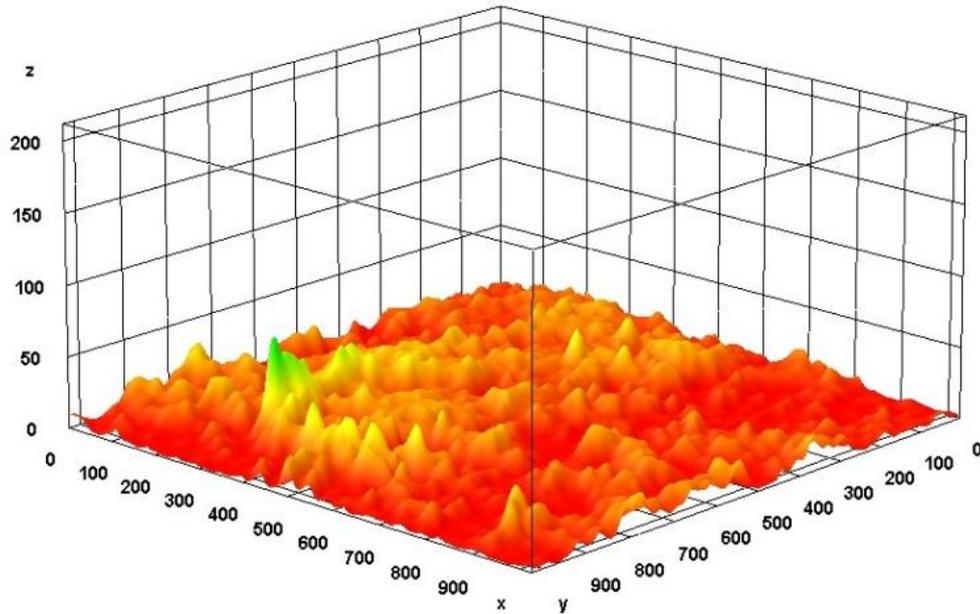


Figura 31. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por *S. mutans* e *C. albicans*.

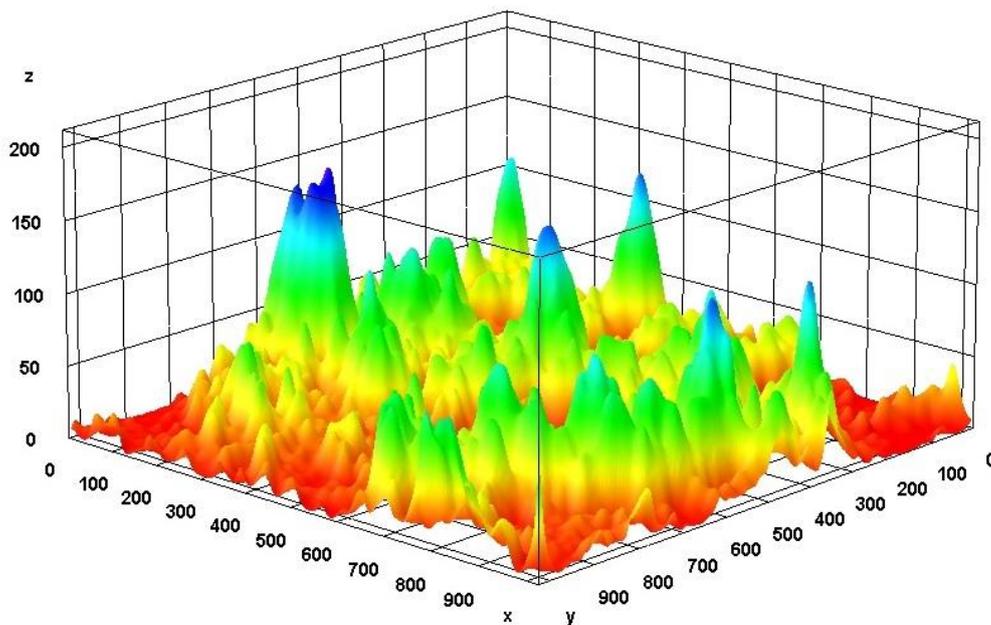


Figura 32. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por *S. mutans* e *C. albicans* crescido na presença do sobrenadante de *S. mutans*.

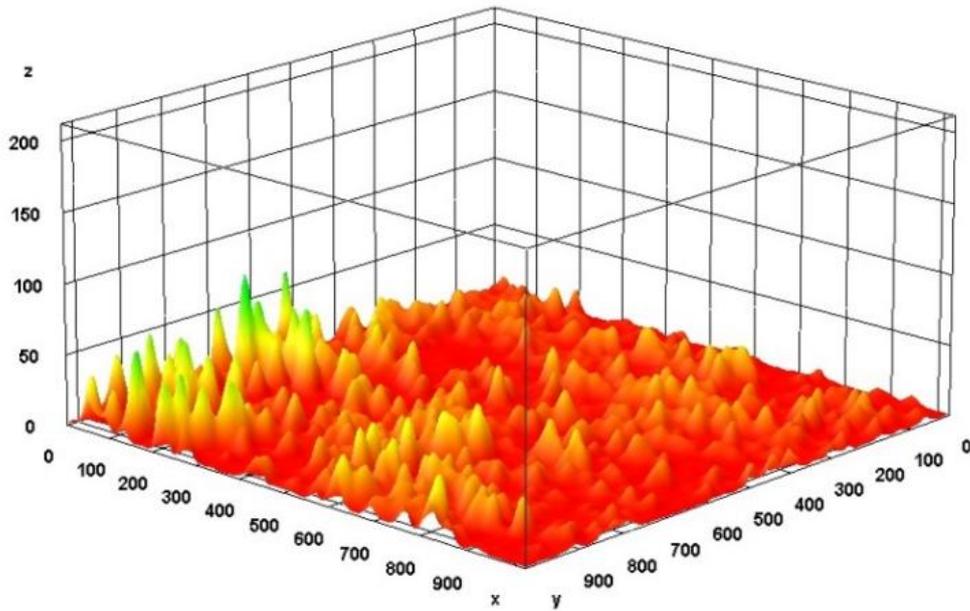


Figura 33. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por *S. mutans* e *C. albicans* crescido na presença do sobrenadante de *C. albicans*.

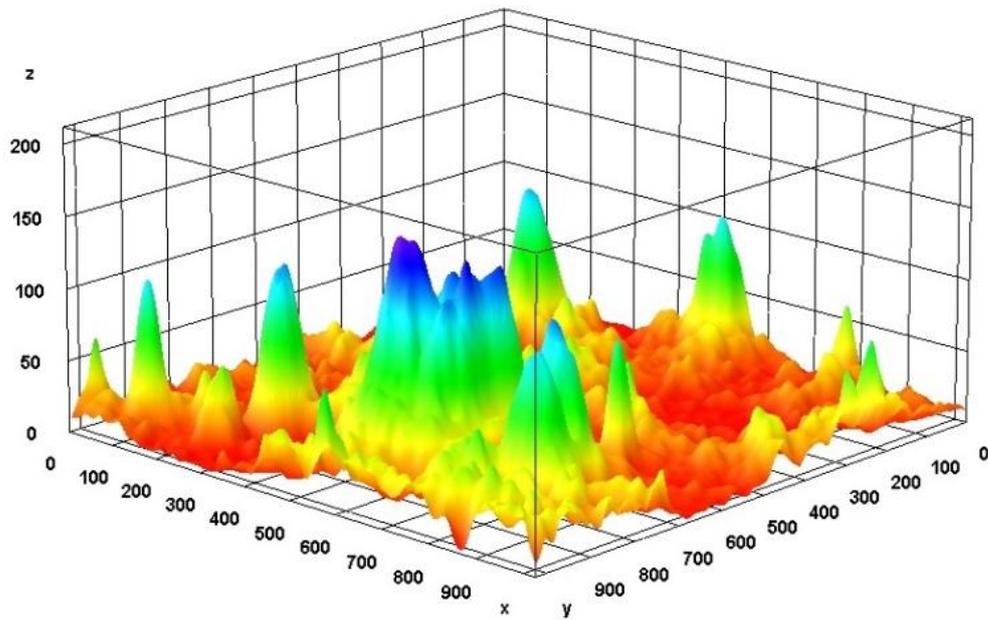


Figura 34. Arquitetura tridimensional da superfície do biofilme duo-espécie composto por *S. mutans* e *C. albicans* crescido na presença do sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans*.

## 8DISCUSSÃO

Nesse estudo, investigou-se a influência dos sobrenadantes de *S. mutans* e *C. albicans* juntos ou isolados na formação do biofilme mono e duo-espécie desses microrganismos. Os dois microrganismos foram escolhidos devido aos estudos prévios que demonstraram que a interação entre eles pode modular o desenvolvimento da cárie dentária (NIKAWA *et al.*, 2003; METWALLI *et al.*, 2013; FALSETTA *et al.*, 2014; FELDMAN *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2017).

A microbiologia do biofilme cariogênico é complexa e desperta grande interesse em pesquisadores do mundo inteiro. Embora o *S. mutans* seja um microrganismo reconhecidamente cariogênico, ele não está sozinho nesse biofilme (METWALLI, *et al.*, 2013; FALSETTA *et al.*, 2014). Existem evidências de que a interação entre eles pode modular a virulência e a formação do biofilme, além de alterar o curso da doença, através de moléculas de QS excretadas no meio extracelular, que interagem com outros microrganismos presentes no biofilme (SZTAJER *et al.*, 2014). As interações entre bactérias e fungos vêm sendo explorada com o objetivo de melhorar o entendimento da doença (LIU *et al.*, 2017).

Apesar dos recentes estudos, não há consenso na literatura sobre o tema e alguns autores afirmam que as moléculas de QS de *C. albicans* influenciam no aumento do potencial cariogênico do *S. mutans* (FALSETTA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2017) apresentando então uma interação simbiótica. Outros postulam que moléculas excretadas pelo *S. mutans* inibem a formação do biofilme de *C. albicans*, gerando uma interação antagônica (JAROSZ *et al.*, 2009; ARIAS *et al.*, 2016; FELDMAN *et al.*, 2016).

Essas incertezas levaram ao desenvolvimento desse estudo, que investigou a hipótese de que presença de moléculas do sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans* modulam a formação do biofilme mono e duo-espécie desses microrganismos. Para isso, os efeitos indiretos que esses microrganismos causam entre si foram avaliados, analisando o biofilme através de UFC/mL/mg, hidrofobicidade relativa das células, produção de polissacarídeos extracelulares e análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura e confocal a laser.

Rodrigues *et al.* (2009) descreveram que a adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade da superfície celular. Verificou-se se o sobrenadante de *S. mutans* e *C. albicans* influenciaram na hidrofobicidade relativa das células microbianas testadas e

observou-se que o sobrenadante de *C. albicans* aumenta a hidrofobicidade do *S. mutans*. Cao *et al.* (2017), descrevem que o farnesol, molécula excretadas por *C. albicans*, regula a expressão do gene *recA* de *S. mutans*, gene relacionado a regulação da adesão da célula, isso em parte por explicar o aumento da hidrofobicidade de *S. mutans* provocado pelo sobrenadante de *C. albicans*.

De acordo com os resultados obtidos, quanto ao biofilme monoespécie de *S. mutans*, ambos os sobrenadantes não influenciaram no aumento ou redução da biomassa do biofilme (UFC/mL/mg), divergindo de Kim *et al.*, 2017, os quais descrevem que metabólitos extracelulares produzidos pela *C. albicans* estimulam crescimento bacteriano. Por outro lado, houve aumento estatisticamente significativo ( $p=0,0002$ ) na produção de polissacarídeos totais de *S. mutans* em contato com seu próprio sobrenadante, da mesma forma, este aumento ocorreu na análise dos PECi, podendo indicar que moléculas extracelulares presentes no sobrenadante de *S. mutans*, influenciam no aumento da virulência do biofilme.

Os resultados de biomassa e PECT de *S. mutans* indicam que a alteração do biofilme pelo sobrenadante pode não estar relacionada à cinética de crescimento, mas sim a produção de matriz de polissacarídeos. Segundo Kim *et al.* (2017), moléculas extracelulares presentes no sobrenadante de *C. albicans* ativam genes de virulências (*gtfs*) de *S. mutans* responsáveis pela produção de matriz extracelular. Isto pode ser a explicação do aumento da produção de polissacarídeos de *S. mutans* quando cultivado com o sobrenadante desta levedura.

No biofilme monoespécie formado por *C. albicans* houve aumento da biomassa e da produção de PECT e PECi quando crescida em contato com sobrenadante de *S. mutans*. O resultado corrobora com os achados de Ellepola *et al.* (2017), que realizou em seu experimento testes com a cepa mutante de *C. albicans* (*bcr1Δ*) e verificou que quando crescida conjuntamente com o *S. mutans*, este parece estimular a sua produção de PEC. O gene *bcr1* é um regulador chave para o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* (NOBILLE; MITCHELL, 2005; NOBILLE *et al.*, 2006) e a cepa *knockout* desse gene (*bcr1Δ*) não produz adequadamente biofilme, entretanto, Ellepola *et al.* (2017), cultivou essa cepa com deleção de gene associada ao *S. mutans* e observou que mesmo na ausência do gene regulador chave a *C. albicans* formou biofilme semelhante à cepa não mutante, sustentando que esses dois microrganismos desempenham uma relação simbiótica.

Em contraste com os nossos resultados e de Ellepola *et al.*, 2017, Barbosa *et al.*, em 2016, descreveram que o sobrenadante de *C. albicans* não reduziu a viabilidade do biofilme,

porém quando cultivada com células de *S. mutans*, a redução ocorreu. Indicando que o sobrenadante não influenciaria na viabilidade, porém as células, sim.

Mogen *et al.*(2015) descrevem que o farnesol excretado pela *C. albicans* na fase inicial de formação do biofilme, quando em altas concentrações pode ter efeito antibacteriano contra *S. mutans*. O achado pode justificar a redução da biomassa na contagem de *S. mutans* no biofilme duo-espécie suplementado com sobrenadante de *C. albicans*, já que nessas condições a concentração do sobrenadante de *C. albicans* foi dobrada e provavelmente a concentração de farnesol também, corroborando com os achados de Cao *et al.*(2017), que descrevem em seus achados que o farnesol, em altas concentrações (>100 µM), pode estar relacionado a regulação dos genes de virulência: *luxS*, *brpA*, *ffh*, *recA*, *nth*, e *smx* de *S. mutans*, relacionados à tolerância ácida, provocando efeito inibitório da viabilidade bacteriana. Curiosamente, no mesmo trabalho, ele observou que em baixas concentrações (25 µM e 50 µM) ocorre o efeito oposto, o aumento da viabilidade de *S. mutans*.

No biofilme duo-espécie, a contagem de *C. albicans* não foi alterada em nem um dos grupos experimentais, este resultado diverge dos encontrados por Hwang *et al.*, 2017, os quais descrevem que moléculas extracelulares presentes no sobrenadante de *S. mutans* estimulam a produção de PEC por *C. albicans*.

Diante desses resultados, foi verificado neste estudo que possivelmente as moléculas de QS presentes no sobrenadante de *S. mutans* favorecem a formação do biofilme de *C. albicans* e a produção de polissacarídeos. Da mesma forma, a literatura tem mostrado que existe uma relação simbiótica entre *S. mutans* e *C. albicans* na superfície do dente (KOO; BOWEN, 2014; NOBILE; JOHNSON, 2015; FELDMAN *et al.*, 2016; ARIAS *et al.*, 2016), mesmo esse *habitat* sendo atípico para a colonização desse fungo.

Um achado importante sobre o assunto foi relatado por Ellepola *et al.*(2017), que por meio da análise em RT-qPCR, descreveu que o *S. mutans* pode regular positivamente a expressão dos genes de virulência *hwp1*, *als1* e *als3* de *C. albicans* e que quando crescidos juntos, ocorre o aumento da expressão desses genes, descaracterizando o que se achava anteriormente (AN *et al.*, 2016), que essa expressão era regulada somente através da ativação do regulador central *bcr*.

Esses achados divergem dos encontrados por Jarosz *et al.*(2009), que relatam que as moléculas de QS de *S. mutans* interferem negativamente na formação do biofilme de *C.*

*albicans*, descrevendo que a molécula de QSCSP (*Competence inducing peptide*) inibe o crescimento de *C. albicans* em co-culturas. Infelizmente há apenas especulação em relação às concentrações fisiológicas de CSP produzidos por *S. mutans*, ainda não se sabe em qual concentração esta molécula é excretada e em qual quantidade ela supostamente afetaria a *C. albicans*.

Pela microscopia eletrônica de varredura, no biofilme monoespécie de *S. mutans* foi evidenciado um aumento da proximidade entre as células quando crescidas em contato com ambos os sobrenadantes, supostamente ocorrido pelo aumento de polissacarídeos, como evidenciado no experimento descrito acima realizado pelo método de Dubois *et al.* (1956). Já no biofilme monoespécie de *C. albicans* não foram evidenciadas diferenças morfológicas entre os grupos.

Entretanto, no biofilme duo-espécie, as imagens de MEV mostram o aumento da filamentação da *C. albicans* crescida em contato com sobrenadante de *S. mutans*, este achado diverge de Jaroz *et al.*, 2009, em que descrevem que moléculas extracelulares de *S. mutans* reduzem a filamentação da *C. albicans*.

As imagens obtidas na microscopia confocal corroboram com os achados obtidos no experimento da análise da biomassa e dos PECT, ou seja, aumento da biomassa no biofilme monoespécie de *S. mutans* e duo-espécie, quando cultivado com sobrenadante de *S. mutans*.

Embora o sobrenadante de *S. mutans* tenha apresentado indícios de influência positiva no biofilme M e D, as interações entre bactérias e fungos patogênicos ainda permanece largamente não caracterizadas.

Em resumo, este estudo fornece novos conhecimentos sobre as interações químicas entre um fungo comensal e um patógeno oral. A habilidade de formar biofilmes pode determinar a patogenicidade das cepas. Por isso, estudar o efeito de substâncias e moléculas na formação destes é de fundamental importância para que cheguemos a um tratamento eficaz e livre de resistência.

## 9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e de acordo com a metodologia pôde-se constatar que:

- Houve aumento da hidrofobicidade das células de *S. mutans* e *C. albicans*, com o sobrenadante de *C. albicans*.
- Aumento da biomassa de *C. albicans*, influenciado pelo sobrenadante de *S. mutans* e redução da biomassa de *S. mutans* com sobrenadante de *C. albicans*, no biofilme monoespécie.
- Aumento na produção de polissacarídeos extracelulares totais de *S. mutans* e *C. albicans* em biofilme mono e duo-espécie, influenciado pelo sobrenadante de *S. mutans*.

## 10 DIREÇÕES FUTURAS

As interações microbianas orais ainda estão longe de ser bem compreendidas. Desvendar as bases do desenvolvimento do biofilme cariogênico contribuirá, não só para o controle da cárie, como também da saúde geral do paciente.

Embora os estudos *in vitro* possam contribuir para a compreensão das complexas associações microbianas e da dinâmica de sua interação no ambiente oral, a imunocompetência do hospedeiro e fatores como dieta e higiene bucal desempenham uma importante função reguladora.

Portanto, a presença de *C. albicans* no ambiente oral pode ser considerado um fator adicional que precisa ser levado em consideração na avaliação dos riscos para a cárie. Para esse fim, estudos futuros devem se realizados com o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas para prevenir cáries dentárias.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P; CASADEVALL, A. *Quorum sensing* in fungi – a review, **Medical Mycology**, v. 50, p. 337–345, 2012.
- ALEM, M. A. S.; OTEEF, M. D. Y.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of Tyrosol by *C. albicans* Biofilms and Its Role in *Quorum sensing* and Biofilm Development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770–1779, 2006.
- AN, D.; WANG, X.; LI, J.; JIANG, S.; MA, X.; ZHANG, H.; SHI, H.; SUN, H.; YE, L. The activity of fungichromin against the formation of *C. albicans* biofilm. **Biol. Pharm. Bull.** v. 39, p. 1948–1954, 2016.
- ANDERSON, M. Z.; BENNETT, R. J. Budding off: bringing functional genomics to *C. albicans*. **Briefings in Functional Genomics**, v. 15, n. 2, p. 85–94, 2016.
- ARIAS, L.S., DELBEM, A.C.B., FERNANDES, R.A., BARBOSA, D.B.; MONTEIRO, D.R. Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. **J. Appl Microbiol.**v. 120, p. 1240–1249, 2016.
- BARBOSA, J. O.; ROSSONI, R. D.; VILELA, S. F. G.; DE ALVARENGA, J. A.; VELLOSO, M.; DOS S., PRATA, M. C. DE A.; JUNQUEIRA, J. C. *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *C. albicans*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 16 p, 2016.
- BASSLER, L.; LOSICK, R. Bacterially speaking. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 237-246, 2006.
- BODELÓN, G.; MONTES-GARCÍA, V.; LÓPEZ-PUENTE, V.; HILL, E. H.; HAMON, C.; SANZ-ORTIZ, M. N.; SCARABELLI, L. Detection and imaging of *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. **Nature materials**, v. 15, n. 11, p. 1203-1211, 2016.
- BORGES, M. F.; DE CASTILHO, A. R. F.; PEREIRA, C. V. "Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo *in situ* e *in vitro*." **Rev. Odonto Ciênc**, v. 23, n. 4, p. 360-364, 2008.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries research**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- BOWEN WH, BURNE RA, WU H, KOO H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiol.** v. 17, 14 p, 2017.
- BOWEN WH, AMSBAUGH SM, MONELL-TORRENS S, BRUNELLE J, KUZMIAK-JONES H, COLE MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. **J Am Dent Assoc.**1980 v. 5, p. 677-81, 1980.

- CAO L, ZHANG Z, XU S, MA M, WEI X. Farnesol inhibits development of caries by augmenting oxygen sensitivity and suppressing virulence-associated gene expression in *Streptococcus mutans*. **Journal of Biomedical Research**. v. 4, p. 333-343, 2017.
- CCAHUANA-VASQUEZ; R. A; CURY, J. A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz. Oral Res.**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2010.
- CHIN, V. K.; LEE, T. Y.; RUSLIZA, B.; CHONG, P. P. Dissecting *C. albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host–Pathogen Interaction: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1643, 2016.
- CLAESSEN D.; ROZEN D.E; KUIPERS O.P; SØGAARD-ANDERSEN L.; VAN WEZEL, G. P. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 115, 2014.
- COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, p. 25-30, 2007.
- COSTERTON, J. W., G. G. GEESEY, AND G. K. CHENG. How bacteria stick. **Sci. Am.** v. 238, p. 86–95, 1978.
- DÍAZ-GARRIDO, N.; LOZANO, C.; GIACAMAN, R. A. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. **European Journal of Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 345–350, 2016.
- DIAZ, P. I.; XIE, Z.; SOBUE, T.; THOMPSON, A.; BIYIKOGLU, B.; RICKER, A., ... DONGARI-BAGTZOGLU, A. Synergistic interaction between *C. albicans* and commensal oral streptococci in a novel *in vitro* mucosal model. **Infection and immunity**, v. 80, n. 2, p. 620-632, 2012.
- DONG Y. H.; ZHANG L. H. *Quorum sensing* and *quorum quenching* enzymes. **J. Microbiol.** v. 43, p. 101–109, 2005.
- DUBOIS, M; GILLES, K; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p. 350-356, 1956.
- DUQUE, C., STIPP, R. N., WANG, B., SMITH, D. J., HÖFLING, J. F., KURAMITSU, H. K., ... MATTOS-GRANER, R. O. Downregulation of GbpB, a Component of the VicRK Regulon, Affects Biofilm Formation and Cell Surface Characteristics of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 786–796, 2011.
- EGBE, N. E., DORNELLES, T. O., PAGET, C. M., CASTELLI, L. M., & ASHE, M. P. Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in *C. albicans* and *S. cerevisiae*. **Microbial Cell**, v. 4, p. 294-304, 2017.
- ELLEPOLA, K, Y. LIU, T. CAO, H. KOO, C.J. Seneviratne. Bacterial GtfB Augments *C. albicans* Accumulation in Cross-Kingdom Biofilms. **Journal of Dental Research**, v. 10, p. 1129 – 1135, 2017.

- FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I.; COLONNE, P. M.; SCOTT-ANNE, K.; GREGOIRE, S.; PAI, C.-H., ... KOO, H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *C. albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infection and immunity**, v. 82, n. 5, p. 1968-1981, 2014.
- FELDMAN, M.; GINSBURG, I.; AL-QUNTAR, A.; STEINBERG, D. Thiazolidinedione-8 alters symbiotic relationship in *C. albicans*-*S. mutans* dual species biofilm. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 12 p, 2016.
- FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.*, v. 8, n.3, p.182-91, 2004.
- FERNANDES, R. A.; MONTEIRO, D. R.; ARIAS, L. S.; FERNANDES, G. L.; DELBEM, A. C. B.; BARBOSA, D. B. Biofilm formation by *C. albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. **Biofouling**, v. 32, n. 3, p. 329-338, 2016.
- FETZNER, S. Quorum quenching enzymes. **Journal of biotechnology**, v. 201, p. 2-14, 2015.
- FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A.; BARRET, M.; TARKKA, M.; SARNIGUET, A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 4, p. 583-609, 2011.
- GIAOURIS, E., HEIR, E., DESVAUX, M., HÉBRAUD, M., MØRETRØ, T., LANGSRUD, SIMÕES, M. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 841-867, 2015.
- GREGOIRE, S.; XIAO, J.; SILVA, B. B.; GONZALEZ, I.; AGIDI, P. S.; KLEIN, M. I., ... KOO, H. Role of glucosyltransferase B in interactions of *C. albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6357-6367, 2011.
- GUO, L.; HU, W.; HE, X.; LUX, R.; MCLEAN, J.; SHI, W. Investigating Acid Production by *Streptococcus mutans* with a Surface-Displayed pH-Sensitive Green Fluorescent Protein. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57182, 2013.
- HAMILTON, I. R.; N. D. BUCKLEY. "Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance." **Molecular Oral Microbiology**, v.6, n. 2, p. 65-71, 1991.
- HARRIS, G. S.; MICHALEK, S. M.; CURTISS, R. Cloning of a locus involved in *Streptococcus mutans* intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-efficient mutant. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 8, p. 3175-3185, 1992.
- HE, J.; KIM, D.; ZHOU, X.; AHN, S. J.; BURNE, R. A.; RICHARDS, V. P.; KOO, H. RNA-Seq Reveals Enhanced Sugar Metabolism in *Streptococcus mutans* Co-cultured with *C. albicans* within Mixed-Species Biofilms. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 15 p, 2017.

- HE, Z. Y. *et al.* Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 1, p. 30-35, 2012.
- HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; ... NICKERSON, K. W. *Quorum sensing* in the dimorphic fungus *C. albicans* mediated by farnesol. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.
- HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N.; WETZEL, W. E.; CHAKRABORTY, T.; DOMANN, E. Clonal identity of *C. albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre- school children. **Molecular Oral Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 302-308, 2003.
- HOSSEINI, N.; YAZDANPANA, S.; SAKI, M.; REZAZADEH, F.; GHAPANCHI, J.; ZOMORODIAN, K. Susceptibility of *C. albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. **Journal of Dentistry**, v. 17, n. 4, p. 354, 2016.
- HWANG, G.; MARSH, G.; GAO, L.; WAUGH, R.; KOO, H. Binding Force Dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *C. albicans*. Binding Force Dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *C. albicans*. **Journal of dental research**, v. 94, p. 1310-1317, 2015.
- JAROSZ, L. M; DENG, D. M; VAN, D. E. R, MEI, H. C.; CRIELARD, W; KROM, B. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *C. albicans* hypha formation. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 11, p. 1658-1664, 2009.
- KASSEBAUM, N. J.; BERNABÉ, E.; DAHIYA, M.; BHANDARI, B.; MURRAY, C. J. L.; MARCENES, W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. **Journal of dental research**, v. 94, n. 5, p. 650-658, 2015.
- KAWADA-MATSUO, M.; OOGAI, Y.; KOMATSUZAWA, H. Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*. **Genes**, v. 8, n. 1, p. 11, 2017.
- KEARNS, C. E.; GLANTZ, S. A.; SCHMIDT, L. A. Sugar industry influence on the scientific agenda of the National Institute of Dental Research's 1971 National Caries ProGram: a historical analysis of internal documents. **PLoS medicine**, v. 12, n. 3, p. e1001798, 2015.
- KHAN, R., JUNGES, R., ÅMDAL, H. A., CHEN, T., MORRISON, D. A., & PETERSEN, F. C. A positive feedback loop mediated by Sigma X enhances expression of the streptococcal regulator ComR. **Scientific Reports**, v. 7, p. 5984, 2017.
- KHAN, R., RUKKE, H. V., HØVIK, H., ÅMDAL, H. A., CHEN, T., MORRISON, D. A., & PETERSEN, F. C. Comprehensive transcriptome profiles of *Streptococcus mutans* UA159 map core Streptococcal competence genes. **Msystems**, v. 1, n. 2, 27 p, 2016.

- KIM D, SENGUPTA A, NIEPA THR *et al.* *C. albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. **Scientific Reports**. v. 7, 14 p, 2017.
- KLEIN, A.M.; MAZUTIS, L.; AKARTUNA, I.; TALLAPRAGADA, N.; VERES, A.; LI, V.; PESHKIN, L.; WEITZ, D.A.; AND KIRSCHNER, M.W. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1187-1201, 2015.
- KOO H, BOWEN WH. *C. albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. **Future microbiology**, v. 9, n. 12, p. 1295–7, 2014.
- KRZYŚCIAK, W., JURCZAK, A., KOŚCIELNIAK, D., BYSTROWSKA, B., & SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 33, n. 4, p. 499-515, 2014.
- LEMONS, J. A.; QUIVEY, J. R. G.; KOO, H.; ABRANCHES, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm?. **Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 436-445, 2013.
- LI, Y. H.; TIAN, X. *Quorum sensing* and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, 2012.
- LINDSAY, A. K.; DEVEAU, A.; PIISPANEN, A. E.; HOGAN, D. A. Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *C. albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 10, p. 1219-1225, 2012.
- LINS DE SOUSA, D.; ARAÚJO LIMA, R.; ZANIN, I. C.; KLEIN, M. I.; JANAL, M. N.; DUARTE, S. Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. **PLoS one**, v. 10, n. 7, p. e0131941, 2015.
- LIU, Y., XU, Y., SONG, Q., WANG, F., SUN, L., LIU, L., ... LI, Y. Anti-biofilm Activities from *Bergenia crassifolia* Leaves against *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1738, 2017.
- LO, H. J., KÖHLER, J. R., DIDOMENICO, B., LOEBENBERG, D., CACCIAPUOTI, A., & FINK, G. R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, n. 5, p. 939-949, 1997.
- MALLICK, E; BENNETT, R. Sensing of the Microbial Neighborhood by *C. albicans*. Ed. Joseph Heitman. **PLoS Pathogens**, v.9, p. 10, 2013.
- MARTINS, M., UPPULURI, P., THOMAS, D. P., CLEARY, I. A., HENRIQUES, M., LOPEZ-RIBOT, J. L., & OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *C. albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323-331, 2010.
- MASHBURN-WARREN, L.; MORRISON, D. A.; FEDERLE, M. J. A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. **Mol Microbiol**, v. 78, n. 3, p. 589-606, 2010.
- MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *C. albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current genetics**, v. 59, n. 4, p. 251-264, 2013.

- MATSUI, R.; CVITKOVITCH, D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. **Future microbiology**, v. 5, n. 3, p. 403-417, 2010.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *C. albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- METWALLI, KH, KHAN SA, KROM BP, JABRA-RIZK MA. *Streptococcus mutans*, *C. albicans* and the human mouth: a sticky situation. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, 5 p, 2013.
- MOGEN AB, CHEN F, AHN S-J, BURNE RA, WANG D, RICE KC. Pluronic-Formulated Farnesol Promotes Efficient Killing and Demonstrates Novel Interactions with *Streptococcus mutans* Biofilms. **PLoS ONE**. v. 10, 18 p, 2015.
- MORALES, D. K., GRAHL, N., OKEGBE, C., DIETRICH, L. E. P., JACOBS, N. J., & HOGAN, D. A. Control of *C. albicans* Metabolism and Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines. **Mbio**, v. 4, n. 1, p. 512-26, 2013.
- MORALES DK, HOGAN DA. *Candida albicans* Interactions with Bacteria in the Context of Human Health and Disease. Madhani HD, ed. **PLoS Pathogens**. v. 4, 2010.
- NIKAWA, H., YAMASHIRO, H., MAKIHIRA, S., NISHIMURA, M., EGUSA, H., FURUKAWA, M., SETIJANTO, D. AND HAMADA, T. *In vitro* cariogenic potential of *C. albicans*. **Mycoses**, v. 46, p. 471–478, 2003.
- NISHI, S. M *et al.* Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 8-14, 2009.
- NOBILE CJ, JOHNSON AD. *C. albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.
- PAPPAS, P. G., KAUFFMAN, C. A., ANDES, D. R., CLANCY, C. J., MARR, K. A., OSTROSKY-ZEICHNER, L., ... SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 1-50, 2016.
- PEREIRA DFA, SENEVIRATNE CJ, KOGA-ITO CY, SAMARANAYAKE LP. Is the oral fungal pathogen *C. albicans* cariogenic?. **Oral Dis**. p.1–9, 2017
- PEREIRA-CENCI, T., DENG, D. M., KRANEVELD, E. A., MANDERS, E. M. M., CURY, A. A. D. B., TEN CATE, J. M., & CRIELAARD, W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *C. albicans* biofilms formed on different surfaces. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 8, p. 755-764, 2008.
- PIVA, E., VILELA, S. F. G., JORGE, A. O. C., JUNQUEIRA, J. C., ROSSONI, R. D., & BARBOSA, J. D. O. Interação entre *Escherichia coli* e *C. albicans* em biofilmes formados *in vitro*: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, v. 40, n. 5, 2011.

- RAJA, M.; HANNAN, A.; ALI, K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. **Caries research**, v. 44, n. 3, p. 272-276, 2010.
- RAUT, J. S., BANSODE, B. S., JADHAV, A. K., & KARUPPAYIL, S. M. Activity of Allyl Isothiocyanate and Its Synergy with Fluconazole Against *C. albicans* Biofilms. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 685, 2017.
- RECK, M., TOMASCH, J.; WAGNER-DÖBLER, I. The alternative sigma factor SigX controls bacteriocin synthesis and competence, the two *quorum sensing* regulated traits in *Streptococcus mutans*. **PLoS genetics**, v. 11, n. 7, 31p, 2015.
- REN, Z., CUI, T., , J., CHEN, L., ZHANG, W., XU, X., ... LI, Y. Molecule Targeting Glucosyltransferase Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 126-135, 2016.
- RODRIGUES L.B., SANTOS L.R., RIZZO N.N., TAGLIARI V.Z., OLIVEIRA A.P., TRENHAGO G., RODEGHERI S.C., TAGLIETI R.M., DICKEL E.L. & NASCIMENTO V.P. 2009. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por Salmonella Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.3, p. 225-230, 2009.
- SANDAI, D., TABANA, Y. M., OUWEINI, A. E., & AYODEJI, I. O. Resistance of *C. albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 11, 2016.
- SANTOS, A. A. D., SÁ, E. A. C. D., GAZIRI, L. C. J., & FELIPE, I. Treatment of serum with supernatants from cultures of *C. albicans* reduces its serum-dependent phagocytosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 79-83, 2002.
- SAVILLE, S. P., LAZZELL, A. L., MONTEAGUDO, C., & LOPEZ-RIBOT, J. L. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *C. albicans* during Infection. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 1053–1060, 2003.
- SCHMALRECK, A. F., LACKNER, M., BECKER, K., FEGELER, W., CZAIIKA, V., ULMER, H., & LASS-FLÖRL, C. Phylogenetic relationships matter-antifungal susceptibility among clinically relevant yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01799-13, 2013.
- SCHNEIDER, P. F.; RILEY, T. V. Cell-surface hydrophobicity of *Staphylococcus saprophyticus*. **Epidemiology & Infection**, v. 106, n. 1, p. 71-75, 1991.
- SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *C. albicans* biology and virulence. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- SHANKER, E.; FEDERLE, M. J. *Quorum sensing* Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. **Genes**, v. 8, n. 1, p. 15, 2017.

SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA; RIZK, M. A. Cross kingdom interactions: *C. albicans* and bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. cap. 25, p. 266-267, 2004.

SOLL, D.R., DANIELS, K.J. Plasticity of *C. albicans* biofilms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 80, p. 565–595, 2016.

SPATAFORA, G. A., SHEETS, M., JUNE, R., LUYIMBAZI, D., HOWARD, K., HULBERT, R., ... HUDSON, M. C. Regulated Expression of the *Streptococcus mutans* *dlt* Genes Correlates with Intracellular Polysaccharide Accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 8, p. 2363–2372, 1999.

SPOLIDORIO, D. M. P.; DUQUE, C. **Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica-Vol. 1-Série Abeno**. Artes Médicas Editora, 2013.

STIPP, R. N.; GONCALVES, R. B.; HÖFLING, J. F.; SMITH, D. J.; MATTOS- GRANER, R. O. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 466-473, 2008.

SUN, J., DANIEL, R., WAGNER-DÖBLER, I., A-P. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 1, p. 36, 2004.

SZTAJER, H., SZAFRANSKI, S. P., TOMASCH, J., RECK, M., NIMTZ, M., ROHDE, M., WAGNER-DÖBLER, I. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *C. albicans*. **The ISME journal**, v. 8, n. 11, p. 2256, 2014.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **Journal of dental research**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.

TAKAMORI, S., TOYOKAWA, G., TAKADA, K., SHOJI, F., OKAMOTO, T., & MAEHARA, Y. Combination Therapy of Radiotherapy and Anti-PD-1/PD-L1 Treatment in Non-Small-cell Lung Cancer: A Mini-review. **Clinical Lung Cancer**, 2017.

TALAGRAND-REBOUL, E.; JUMAS-BILAK, E.; LAMY, B. The social life of *Aeromonas* through biofilm and *quorum sensing* systems. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 19 p, 2017.

THOMPSON, S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TRENTIN, D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

VERBEKE, F.; DE CRAEMER, S.; DEBUNNE, N.; JANSSENS, Y.; WYNENDAELE, E.; VAN DE WIELE, C.; DE SPIEGELEER, B. Peptides as *Quorum sensing* Molecules: Measurement Techniques and Obtained Levels *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in neuroscience**, v. 11, 18 p, 2017.

VIEIRA, J. D. G.; RIBEIRO, E. L.; CAMPOS, C. D. C.; PIMENTA, F. C.; TOLEDO, O. A. D.; NAGATO, G. M., ... ARAÚJO-JÚNIOR, C. A. D.C. *albicans* isolated from buccal cavity of children with Down's syndrome: occurrence and growth inhibition by *Streptomyces* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 383-386, 2005.

VÍLCHEZ R, LEMME A, BALLHAUSEN B, THIEL V, SCHULZ S, JANSEN R, SZTAJER H, WAGNER-DÖBLER I. *Streptococcus mutans* inhibits *C. albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). **Chembiochem**. 2010 Jul 26;11(11):1552-62. doi: 10.1002/cbic.201000086.

WADE, W. G. Characterisation of the human oral microbiome. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, p. 143-148, 2013.

WASSEL, M. O.; KHATTAB, M. A. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 4, p. 387-392, 2017.

WEBER, K., DELBEN, J.; BROMAGE, T. G.; DUARTE, S. Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. **FEMS microbiology letters**, v. 350, n. 2, p. 175-179, 2014.

WEN, Z. T; BURNE, R. A. LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2682-2691, 2004.

WILKINSON, H. N.; MCBAIN, A. J.; STEPHENSON, C.; HARDMAN, M. J. Comparing the Effectiveness of Polymer Debriding Devices Using a Porcine Wound Biofilm Model. **Advances in wound care**, v. 5, n. 11, p. 475-485, 2016.

WOZNIAK D. J.; PARSEK M. R. Surface-associated microbes continue to surprise us in their sophisticated strategies for assembling biofilm communities. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.

XIAO, J., MOON, Y., LI, L., RUSTCHENKO, E., WAKABAYASHI, H., ZHAO, X., ... KOPYCKA-KEDZIERAWSKI, D. T. *C. albicans* Carriage in Children with Severe Early Childhood Caries (S-ECC) and Maternal Relatedness. **PLoS one**, v. 11, n. 10, p. e0164242, 2016.

XU, H.; SOBUE, T.; THOMPSON, A.; XIE, Z.; POON, K.; RICKER, A.; ... DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Streptococcal* co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 2, p. 214-231, 2014.

YAVAGAL, P. C.; SINGLA, H. Prevalence of dental caries based on personality types of 35–44 years old residents in Davangere city. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 7, n. 1, p. 32-35, 2017.

ZHAO, W.; LI, W.; LIN, J.; CHEN, Z.; YU, D. Effect of sucrose concentration on sucrose-dependent adhesion and glucosyltransferase expression of *S. mutans* in children with severe early-childhood caries (S-ECC). **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3572-3586, 2014.