



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

JÉSSICA DIANE DOS SANTOS

**EFEITOS DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE *Streptococcus mutans* SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *C. albicans*:
estudos *in vitro* e *in vivo***

2021

JÉSSICA DIANE DOS SANTOS

**EFEITOS DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE *Streptococcus mutans*
SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *C. albicans*:
estudos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Jéssica Diane Dos

Efeitos do sobrenadante da cultura de Streptococcus mutans sobre os fatores de virulência de C. albicans: estudos in vitro e in vivo / Jéssica Diane Dos Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
59 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. Streptococcus mutans. 2. Candida albicans. 3. Fatores de virulência. 4. Candidose experimental. 5. Galleria mellonella. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Julhiany de Fátima da Silva

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Medicina de Botucatu

Prof. Jônatas Rafael de Oliveira

Universidade Anhembi Morumbi (UAM)

Faculdade de Medicina

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 08 de julho de 2021.

DEDICATÓRIA

À Deus, por sempre me guiar e iluminar meu caminho, me ajudando a ultrapassar todos os obstáculos.

À minha querida Mãe Roseli, que sempre foi minha inspiração para lutar por tudo aquilo que acredito e desejo. Que com todo carinho, apoio e dedicação nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Seu incentivo foi a chave para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

À minha filha Yasmin, que ilumina a minha vida e me dá forças para seguir. Obrigada pela compreensão e carinho durante todo o período no qual não pude dedicar-lhe a devida atenção.

Ao meu companheiro Roger, que esteve sempre ao meu lado, agradeço pela paciência, apoio, compreensão e colaboração durante todo o Doutorado. Obrigada por me amar, acreditar em mim e incentivar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira, minha eterna admiração pela pessoa que é, com um coração imenso, sempre orientando com muita dedicação e paciência. Sou muito grata por despertar em mim o gosto pela pesquisa, por todo o conhecimento transmitido e oportunidades que me proporcionaram momentos inesquecíveis dentro e fora do laboratório. Foram muitos anos, aproximadamente 12, que me ajudaram muito em meu crescimento profissional e pessoal, e que ficarão marcados para sempre em minha vida.

À minha querida amiga e companheira de laboratório Maíra Terra Garcia, que esteve presente em todas as etapas desse trabalho, sua ajuda foi muito importante para que eu conseguisse chegar até aqui. Agradeço imensamente por seu apoio, não só dentro do laboratório, mas na vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa da diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló e da vice-diretora Profa. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, pela oportunidade e suporte para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Doutorado, através do Processo nº 140222/2018-9 no período de 08/02/2018 à 31/12/2018.

À todos os professores pelo convívio durante a realização das disciplinas, pelo apoio e ensinamentos.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal, Domingos Gonçalves Pontes, que foi essencial para qualidade da pesquisa.

À querida amiga e ex-parceira de trabalho Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, com quem trabalhei diretamente durante o mestrado e compartilhamos grandes momentos devido a pesquisa, tornando-se uma grande amiga que com certeza levarei para a vida.

À Janaína Araújo de Alvarenga, amizade que começou na graduação, estendendo-se para a pós-graduação e com certeza para toda a vida. Obrigada por mesmo distante estar sempre presente nas minhas conquistas e por sempre acreditar em meu potencial.

À Marisol dos Santos Velloso, amizade que nasceu na Microbiologia, e com quem tive o prazer de ser aluna de Iniciação Científica. E mesmo após cada uma seguir seu caminho a amizade só cresce. Obrigada pelos momentos de descontração e pela força nos momentos difíceis.

Ao Rodnei Dennis Rossoni, grande exemplo de pesquisador, uma das primeiras pessoas com quem tive contato no laboratório. Obrigada por toda ajuda durante minha caminhada na microbiologia. Torço muito por você.

Aos amigos, alunos de Pós-Graduação, companheiros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal, pela disposição, carinho, paciência e pelos momentos de descontração. Todos foram essenciais para o bom andamento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Líliliana Scorzoni pela companhia, sua boa vontade e por estar sempre disposta a nos ajudar.

A todos os funcionários do ICT-UNESP, em especial à equipe da Seção Técnica de Pós-Graduação, pela paciência, prontidão no atendimento, e amizade conquistada durante o curso de mestrado.

A minha querida família e amigos, agradeço pelo carinho e apoio em todos os momentos difíceis.

A todos, enfim, que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Micro-organismos	18
3.2 Preparo do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	18
3.3 Preparo da suspensão padronizada de <i>C. albicans</i>	19
3.4 Exposição de <i>C. albicans</i> ao sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	19
3.5 Contagem do número de células viáveis de <i>C. albicans</i> após exposição ao sobrenadante de <i>S. mutans</i> e padronização das suspensões de <i>C. albicans</i> para os testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	20
3.6 Estudo <i>in vitro</i> dos efeitos do sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre os fatores de virulência de <i>C. albicans</i>	20
3.6.1 Determinação da atividade proteolítica extracelular <i>in vitro</i>	20
3.6.2 Filamentação de <i>C. albicans</i>	21
3.6.3 Aderência de <i>C. albicans</i> à lamínulas de vidro.....	22
3.6.4 Formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i>	23
3.6.4.1 Determinação do número de UFC/mL	23
3.6.4.2 Quantificação do biofilme por Cristal Violeta	24
3.7 Estudo <i>in vivo</i> dos efeitos do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i> sobre a patogenicidade de <i>C. albicans</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	25
3.7.1 Infecção de <i>C. albicans</i> em <i>Galleria mellonella</i> e divisão dos grupos experimentais	25
3.7.2 Determinação da curva de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i>	26
3.7.3 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL de <i>C. albicans</i>	27
3.7.4 Densidade hemocitária	28
3.8 Análise estatística	28

4 RESULTADO	29
4.1 Efeitos do sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre o crescimento de <i>C. albicans</i>	29
4.2 Estudo <i>in vitro</i> dos efeitos do sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre os fatores de virulência de <i>C. albicans</i>.....	31
4.2.1 Determinação da atividade proteolítica extracelular	31
4.2.2 Filamentação de <i>C. albicans</i>.....	32
4.2.3 Aderência de <i>C. albicans</i> à lamínulas de vidro	34
4.2.4 Análise dos biofilmes de <i>C. albicans</i> por determinação do número de células viáveis (UFC)	36
4.2.5 Análise dos biofilmes por quantificação da biomassa total	37
4.3 Estudo <i>in vivo</i> dos efeitos do sobrenadante de <i>S. mutans</i> sobre <i>C. albicans</i>	38
4.3.1 Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>.....	38
4.3.2 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL	40
4.3.3 Densidade hemocitária	41
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

Santos JD. Efeitos do sobrenadante da cultura de *Streptococcus mutans* sobre os fatores de virulência de *C. albicans*: estudos *in vitro* e *in vivo* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

Candida albicans possui capacidade de causar uma ampla variedade de manifestações clínicas devido a múltiplos fatores de virulência que agem simultaneamente para vencer o sistema imune e invadir os tecidos do hospedeiro. Estudos recentes demonstraram que o crescimento de *C. albicans* pode ser inibido por metabólitos produzidos por *Streptococcus mutans*, que estão presentes no sobrenadante da cultura bacteriana. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar se o sobrenadante da cultura de *S. mutans*, além de inibir o crescimento de *C. albicans*, é capaz de atenuar os mecanismos de virulência desse fungo. Inicialmente, uma suspensão padronizada de *S. mutans* (10^7 células/mL) foi incubada em caldo BHI a 37°C por 4 h em 5% de CO₂. O crescimento em BHI foi filtrado em membrana de 0,22 µm, obtendo-se o sobrenadante da cultura de *S. mutans* livre de células. A seguir, uma suspensão padronizada de *C. albicans* (10^7 células/mL) foi adicionada ao sobrenadante filtrado da cultura de *S. mutans* em caldo BHI, sendo incubada a 37°C por 24 h. Para os grupos controle, a suspensão de *C. albicans* foi colocada em caldo BHI ou YPD esterilizados e incubada nas mesmas condições. Após o período de incubação, o crescimento de *C. albicans* foi centrifugado e lavado para obtenção de uma suspensão padronizada de *C. albicans* contendo as células sobreviventes da exposição ao sobrenadante de *S. mutans*. Essa suspensão de *C. albicans* foi então utilizada nos testes *in vitro* e *in vivo* para determinação dos fatores de virulência desse micro-organismo. No estudo *in vitro*, foi investigada a atividade proteolítica extracelular de *C. albicans*, bem como sua capacidade de filamentação, adesão e formação de biofilmes (1:30, 6, 24 e 48 h). Para o estudo *in vivo*, foi utilizado o modelo de *Galleria mellonella*, analisando-se a curva de sobrevivência, o número de células fúngicas e hemócitos na hemolinfa de larvas infectadas por *C. albicans*. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA, teste de Tukey, Kruskal-Wallis e Log-rank, com nível de significância de 5%. Verificou-se que as células de *C. albicans* expostas ao sobrenadante de *S. mutans* apresentaram redução na filamentação, formação de biofilmes e patogenicidade em *G. mellonella* em relação ao controle. A exposição ao sobrenadante de *S. mutans* também mudou o padrão de aderência de *C. albicans*. Entretanto, o sobrenadante de *S. mutans* não reduziu a atividade proteolítica de *C. albicans*. Concluiu-se que o sobrenadante de *S. mutans* apresentou capacidade de inibir importantes mecanismos de virulência de *C. albicans*, podendo ser uma fonte de novos agentes antifúngicos a ser explorada.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. Fatores de virulência. Candidose experimental. *Galleria mellonella*.

Santos JD. Effects of the culture supernatant of Streptococcus mutans on the virulence factors of C. albicans: in vitro and in vivo studies [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp); Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Candida albicans has the ability to cause a wide variety of clinical manifestations due to multiple virulence factors that act simultaneously to overcome the immune system and invade host tissues. Recent studies have shown that the growth of C. albicans can be inhibited by metabolites produced by Streptococcus mutans. Thus, the objective of this study was to investigate whether the culture supernatant of S. mutans is able to attenuate the virulence mechanisms of this fungus. Initially, a standardized suspension of S. mutans (10^7 cells/mL) was incubated in BHI broth at 37°C for 4 h in 5% CO₂. The growth in BHI was filtered through a 0.22 µm membrane, obtaining the cell free culture supernatant of S. mutans. Then, a standardized suspension of C. albicans (10^7 cells/mL) was prepared and added to the supernatant of the culture of S. mutans in BHI broth, being incubated at 37°C for 24 h. For the control groups, the suspension of C. albicans was placed in sterile BHI or YPD broth and incubated under the same conditions. After the incubation period, the growth of C. albicans was centrifuged and washed to obtain a standardized suspension of C. albicans containing the surviving cells from exposure to the S. mutans supernatant. This suspension of C. albicans was then used to perform in vitro and in vivo tests to determine the virulence factors of this microorganism. In the in vitro study, the extracellular proteolytic activity of C. albicans was investigated, as well as its capacity for filamentation, adhesion and biofilm formation (1:30, 6, 24 and 48 h). For the in vivo study, the Galleria mellonella model was used, analyzing the survival curve, the number of fungal cells and hemocytes in the hemolymph of larvae infected with C. albicans. For statistical analysis, ANOVA, Tukey's test, Kruskal-Wallis and Log-rank were used, with a significance level of 5%. It was found that the cells of C. albicans exposed to the supernatant of S. mutans showed a reduction in filament, formation of biofilms and pathogenicity in G. mellonella in relation to the control. Exposure to the S. mutans supernatant also changed the pattern of adherence of C. albicans. However, the S. mutans supernatant did not reduce the proteolytic activity of C. albicans. It was concluded that the supernatant of S. mutans had the capacity to inhibit important mechanisms of virulence of C. albicans, being able to be a source of new antifungal agents to be explored.

Keywords: Streptococcus mutans. Candida albicans. Virulence factors. Experimental candidosis. Galleria mellonella.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* podem colonizar a microbiota humana desde o nascimento sem causar infecção e coexistir com o hospedeiro durante toda a sua vida (Kadosh et al., 2020). Podem ser encontradas principalmente no trato gastrointestinal, cavidade bucal, aparelhos respiratório e urinário, entre outras localizações (Lohse et al., 2018). No entanto, essa colonização comensal pode se tornar patogênica devido a alterações nos níveis de pH e oxigênio, desequilíbrio na microbiota do hospedeiro (por exemplo, devido ao uso de antibióticos) ou mudanças na resposta imune (causadas por estresse, infecção ou terapia imunossupressora) (Pfaller et al., 2007; Nishimoto et al., 2020).

De todas as espécies de *Candida*, *Candida albicans* predomina em todas as formas de manifestações de doenças em diferentes grupos de pacientes (Whaley et al., 2016). Esse fungo pode ser responsável por infecções superficiais da mucosa e pele chegando até infecções que ameaçam a vida (Gow et al., 2012; Kullberg et al., 2016), como infecções disseminadas da corrente sanguínea com taxas de mortalidade superiores a 40% (Arendrup et al., 2017; Koehler et al., 2019). Esse fato coloca as espécies de *Candida* entre os principais fungos oportunistas (Saliba et al., 2012).

Consistentemente, a capacidade de *C. albicans* em estabelecer um amplo espectro de patologias é atribuída a múltiplos fatores de virulência que agem simultaneamente para vencer as defesas do hospedeiro. Esses fatores podem estar relacionados com a adesão do fungo às células do hospedeiro, o dimorfismo (mudança morfológica da levedura para forma filamentosa), produção de biofilme, produção de enzimas hidrolíticas (Sudbery et al., 2011), como proteinases e fosfolipases, que são capazes de hidrolisar fosfolipídios e proteínas importantes da membrana citoplasmática da célula hospedeira, resultando na ruptura dessa estrutura (Hube et al., 2001; Niewerth et al., 2001).

Assim como para muitos micro-organismos, a capacidade de *C. albicans* em aderir às superfícies é uma característica importante de sobrevivência e/ou patogenicidade. A adesão às células do hospedeiro é considerada uma propriedade de virulência essencial para o desenvolvimento da candidose, uma vez que é a etapa inicial do processo infeccioso em mucosa, especialmente em pacientes

imunocomprometidos (Menezes et al., 2013). *C. albicans* são capazes de aderir a diferentes células e interagir com a matriz extracelular do hospedeiro, assim como a materiais artificiais, sendo portanto, o primeiro passo para o surgimento de infecções. A adesão do fungo é modulada por uma ampla variedade de adesinas, que são biomoléculas expressas na superfície da parede celular que promovem a aderência de *C. albicans* a receptores nas células do hospedeiro. Essa aderência pode ocorrer por reconhecimento específico entre receptores e não específicos por meio de interações iônicas e hidrofóbicas (Silva et al., 2011).

O dimorfismo, ou seja, a capacidade de crescer como leveduras ou formas filamentosas de hifas ou pseudo-hifas, é um dos fatores de virulência mais importante e marcante de *C. albicans* (Geraldino et al., 2012). As pseudo-hifas são morfologicamente distintas, por apresentarem constrições nos locais de septação e serem mais largas do que as hifas. Por outro lado, as hifas formam filamentos longos do tipo tubular com lados completamente paralelos e sem constrições no local da septação (Sudbery et al., 2011). A forma hifal tem um papel fundamental no processo de infecção, pois conseguem invadir mais facilmente as células epiteliais e endoteliais, podendo causar danos pela liberação de enzimas hidrolíticas (Dalle et al., 2010). A capacidade de mudar de levedura para forma filamentosa, além de auxiliar na invasão aos tecidos, também facilita o fungo a escapar das células do sistema imunológico, como macrófagos. A forma de levedura tem um papel importante na disseminação pela corrente sanguínea (Brown et al., 2014). Esta variação de morfologia é induzida por condições ambientais determinadas pela temperatura, valor de pH, concentração de CO₂, presença de nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio e aminoácido) e N-acetil-glicosamina (Saville et al., 2003).

Com a adesão do fungo e desenvolvimento de hifas ocorre a formação de biofilme, que são comunidades estruturadas de células aderidas a superfícies abióticas ou bióticas e envolvidas por uma matriz de polissacarídeos extracelular, produzidas pelos próprios micro-organismos. Durante o desenvolvimento, os biofilmes formam uma mistura de células de leveduras, pseudo-hifas e hifas cercadas pela matriz extracelular (Gulati et al., 2016). Desse modo, os biofilmes facilitam a colonização e invasão dos tecidos hospedeiros (Fox et al., 2012; Lohse et al., 2018). *C. albicans* forma biofilmes em superfícies mucosas, revestimento de células epiteliais, próteses dentárias e em dispositivos médicos implantados, como cateteres,

válvulas cardíacas e dispositivos urinários (Ramage et al., 2006). Quando os biofilmes atingem um estágio de maturação, passam a liberar células de levedura, podendo disseminar infecções para outras partes do hospedeiro (Uppuluri et al., 2018).

Há uma associação positiva entre o grau de virulência do fungo e sua habilidade em formar biofilme, tendo relação direta com a capacidade de *C. albicans* em causar infecções. Os biofilmes também conferem diversas vantagens aos micro-organismos, como sobrevivência em ambientes hostis; proteção ao sistema imunológico do hospedeiro; cooperação metabólica e troca de material genético entre os micro-organismos; e resistência a drogas antifúngicas (Ramage et al., 2012; Mello et al., 2016). As substâncias poliméricas extracelulares presentes na formação do biofilme agem como uma barreira física para as células microbianas que residem nos biofilmes, fazendo com que os biofilmes sejam até 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com células em crescimento planctônico (Penesyanyan et al., 2015). Portanto, os biofilmes exigem maiores concentrações de drogas antifúngicas, o que pode levar a efeitos colaterais do hospedeiro, como danos no fígado e rins (Lebeaux et al., 2014).

Ao contrário dos medicamentos antibacterianos, as classes de antifúngicos disponíveis são bem limitadas, sendo os azóis, polienos e equinocandinas as três principais classes antifúngicas (Costa-de-Oliveira et al., 2020). Os azóis são medicamentos terapêuticos comuns para infecções por *C. albicans* devido à sua alta eficiência e baixa toxicidade, principalmente o fluconazol (FLC). No entanto, o uso prolongado e tratamento profilático, principalmente em pacientes HIV positivos, leva à seleção de cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos (Hunter et al., 1998; Alves et al., 2017). Além disso, as semelhanças entre as células eucarióticas de fungos e humanos complicam consideravelmente o uso de antifúngicos sem toxicidade para o hospedeiro (Seneviratne, Rosa, 2016). Atualmente, vários estudos têm sido realizados para superar esses desafios, envolvendo a identificação de novos agentes antifúngicos, bem como a combinação ou reposicionamento de medicamentos já existentes.

Na busca por novos agentes antifúngicos, tem ocorrido um interesse crescente em relação ao uso de produtos do metabolismo secundário de bactérias para a prevenção e tratamento da candidose. Graham et al. (2017) identificaram a bacteriocina EntV produzida pela bactéria Gram-positiva *E. faecalis*, com efeito na

redução da virulência de *C. albicans* por inibição da filamentação e formação de biofilmes em diferentes modelos experimentais, incluindo *Caenorhabditis elegans* e camundongos. Interessantemente, o EntV reduziu significativamente a filamentação de *C. albicans*, mas não afetou a viabilidade celular. Os autores sugeriram que essa bacteriocina tem potencial como agente antifúngico que visa a virulência e não a viabilidade fúngica. Os efeitos antifúngicos de outras bactérias Gram-positivas também têm sido bastante estudados, como as cepas de *Lactobacillus* que mostram efeitos inibitórios sobre *C. albicans* por meio da produção de bacteriocinas, ácido láctico, peróxido de hidrogênio, levando à alteração de genes reguladores do biofilme e inibição mecânica dos receptores de adesão (Orsi et al., 2013; Santos et al., 2016; Ribeiro et al., 2017; Rossoni et al., 2018; Kim et al., 2019).

Para o controle da candidose, uma das alternativas de estudo tem sido a investigação de produtos secretados por micro-organismos que coexistem naturalmente com as leveduras de *Candida*. Na cavidade oral, as espécies de *Candida* formam biofilmes mistos com *Streptococcus mutans*, uma bactéria patogênica que pode secretar moléculas do *quorum-sensing* com atividade antifúngica. *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva que tem um papel importante na comunidade microbiana oral e na cárie dentária, devido em parte às suas interações variadas com outras bactérias (Kuramitsu et al., 2007), fungos (Vílchez et al., 2010) e células do hospedeiro (Berlutti et al., 2010).

Metabólitos de *S. mutans* com ação sobre *C. albicans* já vem sendo estudados por algum tempo, como por exemplo, o *mutanobactin A*, um peptídeo produzido por *S. mutans* capaz de influenciar a transição micélio-levedura de *C. albicans in vitro* (Joyner et al., 2010). Análogos do *mutanobactin A* também já foram isolados e caracterizados (*mutanobactin B, C e D*). Os efeitos dessas substâncias sobre *C. albicans* (cepa DAY185) foram verificados em biofilmes por meio de ensaios de atividade metabólica com XTT. O composto D foi o inibidor mais potente dos biofilmes com um valor de IC50 (concentração necessária para causar uma redução de 50% na formação de biofilme) de $5,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Os compostos A e B mostraram atividades reduzidas com valores de $3,4 \times 10 \pm 1,3$ e $9,1 \times 10 \pm 1,6 \mu\text{M}$, respectivamente. O *mutanobactin C* não mostrou atividade em concentrações de até $200 \mu\text{M}$. Apesar da ação antibiofilme, nenhum dos compostos reduziu a viabilidade de *C. albicans* (testado em uma faixa de 6,25 a $200 \mu\text{M}$), o que indica que os *mutanobactins* podem

exercer seletivamente seus efeitos inibitórios contra um alvo específico da formação de biofilme (Wang et al., 2012).

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, foi observado que *S. mutans* pode produzir moléculas de sinalização com atividade antifúngica que inibem o crescimento das células de *C. albicans*. Nesse estudo, pela primeira vez a atividade antifúngica do sobrenadante de *S. mutans* foi avaliada *in vivo*, usando *Galleria mellonella* como modelo de estudo. Foi verificada, por análise microscópica do corpo adiposo e de outras estruturas internas das larvas, redução significativa na presença de hifas quando a infecção fúngica foi associada à injeção com sobrenadante de *S. mutans* (Barbosa et al., 2016).

Com o objetivo de isolar as substâncias que demonstraram efeito no estudo citado anteriormente, Santos et al. (2020), extraíram e fracionaram o sobrenadante da cultura de *S. mutans*, buscando agentes antifúngicos capazes de inibir a formação de biofilmes, filamentação e desenvolvimento de candidose. Foi encontrada atividade antibiofilme para as frações SM-F1 e SM-F2 de maneira dependente da dose, e o crescimento de fungos foi reduzido em 2,59 e 5,98 log, respectivamente. Essas frações também foram capazes de reduzir a filamentação de *C. albicans*, porém diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas para a SM-F2. A eficácia da SM-F2 na inibição de *C. albicans* foi confirmada por sua capacidade de regular negativamente os genes de virulência EFG1, CPH1, UME6 e HWP1. O tratamento com SM-F2 também foi capaz de prolongar a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* e reduzir o desenvolvimento de candidose bucal em camundongos. Esses resultados indicaram que a fração SM-F2 contém componentes antifúngicos, demonstrando potencial para ser explorada no tratamento da candidose oral.

Todos esses estudos sobre os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* nos biofilmes de *C. albicans* e candidose foram realizados colocando-se o sobrenadante em contato com os biofilmes formados e doença já instalada. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a exposição prévia de *C. albicans* ao sobrenadante de *S. mutans* pode modificar os fatores de virulência e patogenicidade das células fúngicas sobreviventes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre a virulência de *C. albicans* por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Testar *in vitro* os efeitos do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre vários fatores de virulência de *C. albicans*, incluindo atividade proteolítica extracelular, capacidade de filamentação, adesão e formação de biofilme.
- b) Verificar os efeitos do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre a patogenicidade de *C. albicans* na candidose experimental em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*, por meio da análise da curva de sobrevivência, quantificação de UFC/mL de *C. albicans* da hemolinfa e determinação da densidade hemocitária nas larvas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Para realização desse trabalho foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans* (UA 159) e *Candida albicans* (ATCC 18804), mantidas em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *S. mutans* foi cultivada em ágar Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C em 5% de CO₂ e a cepa de *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C.

3.2 Preparo do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

O preparo do sobrenadante de *S. mutans* foi realizado de acordo com Barbosa et al. (2016). A cepa foi incubada em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) suplementado com 5% de sacarose a 37°C por 24 h em 5% de CO₂. Após este período, as células microbianas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 398 nm e densidade óptica de 0,560, obtendo-se uma concentração de 10⁷ células/mL de *S. mutans*. Um volume de 1 mL da suspensão padronizada foi transferido para um tubo Falcon contendo 6 mL de caldo BHI e incubado novamente a 37°C por 4 h em estufa bacteriológica (5% de CO₂). Após este período, o caldo foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min e filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA), obtendo-se o sobrenadante da cultura de *S. mutans* livre de células.

3.3 Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans*

C. albicans foi cultivada a 37°C por 24 h em caldo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose). Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min, o sobrenadante desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A densidade celular de *C. albicans* foi ajustada em 10^7 células/mL por meio de hemocitômetro, utilizando-se azul de metileno para contagem apenas das células viáveis.

3.4 Exposição de *C. albicans* ao sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Um inóculo de 1 mL da suspensão padronizada de *C. albicans* a 10^7 células viáveis/mL foi acrescentada em 6 mL dos seguintes meios de cultura: caldo YPD, caldo BHI (Infusão cérebro e coração, peptona, glicose, cloreto de sódio e fosfato disódico) e sobrenadante da cultura de *S. mutans*, sendo em seguida incubados a 37°C por 24 h. Portanto, os grupos experimentais foram divididos em: 1) *C. albicans* cultivada em caldo YPD, grupo controle utilizado para análise do crescimento em meio de cultura seletivo para fungo; 2) *C. albicans* cultivada em caldo BHI, meio no qual o sobrenadante de *S. mutans* foi preparado, grupo controle utilizado para descartar o efeito do meio de cultura na virulência do fungo; 3) *C. albicans* cultivada no sobrenadante de *S. mutans* (caldo BHI + metabólitos produzidos por *S. mutans*), grupo teste para avaliar o efeito dos possíveis metabólicos produzidos por *S. mutans* sobre *C. albicans*.

3.5 Contagem do número de células viáveis de *C. albicans* após exposição ao sobrenadante de *S. mutans* e padronização das suspensões de *C. albicans* para os testes *in vitro* e *in vivo*

Após a cultura de *C. albicans* em contato com o sobrenadante de *S. mutans*, ou com os meios de cultura dos grupos controle (YPD e BHI) foi realizado a verificação do pH das culturas. Em seguida o crescimento foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A determinação do número de células da suspensão foi realizada por meio de hemocitômetro, usando-se azul de metileno para a contagem apenas das células viáveis. Esses resultados de contagem de células viáveis foram utilizados para comparação entre os três grupos experimentais, verificando-se assim os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre o crescimento de *C. albicans* e o número de células fúngicas sobreviventes.

A seguir, as suspensões foram diluídas em PBS de forma a padronizar o número de células viáveis igual para os 3 grupos experimentais. Foram padronizadas suspensões de *C. albicans* contendo 10^7 células/mL para os testes *in vitro* e suspensões de 10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL para os estudos *in vivo*.

3.6 Estudo *in vitro* dos efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre os fatores de virulência de *C. albicans*

3.6.1 Determinação da atividade proteolítica extracelular *in vitro*

Para induzir a produção de proteinases aspartil secretoras (Sap), as suspensões de *C. albicans* foram inoculadas em Ágar contendo albumina do soro bovino (BSA, 0,2%), base de carbono de levedura (1,17%) e extrato de levedura (0,01%). O meio foi esterilizado por filtração e adicionado Ágar 2% autoclavado. Após

inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 5 dias. A atividade proteolítica (Pz) das cepas foi determinada da seguinte forma:

$$Pz = \frac{\text{Diâmetro da colônia}}{\text{Diâmetro da colônia} + \text{diâmetro do halo}}$$

Os halos são representados por zonas claras em torno das colônias causadas pela degradação da albumina. Os resultados foram então classificados em negativo ($Pz = 1 \text{ cm}$), positivo ($0,64 \text{ cm} \geq Pz < 1 \text{ cm}$) e fortemente positivo ($Pz < 0,64 \text{ cm}$). Por esse sistema de classificação, um alto valor de Pz indica baixa atividade enzimática.

3.6.2 Filamentação de *C. albicans*

Em placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA), foram aliquoteados 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100 μL da suspensão padronizada de *C. albicans* (10^7 células/mL). As placas contendo os inóculos foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. Após 24 h de incubação, 50 μL do inóculo contido em cada poço da placa de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foram dispersos sobre lâminas de vidro com os campos previamente demarcados no verso da lâmina (Figura 1).

O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e observado em microscópio óptico com aumento de 400x. Foram realizados 5 ensaios para cada grupo experimental. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes em momentos distintos. As imagens foram analisadas em relação ao aspecto morfológico e quantitativo. Para quantificação das hifas presentes, foram analisados 10 campos microscópicos em cada lâmina, sendo padronizado o ponto médio de cada campo para a análise. Para cada campo microscópico foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presentes: 0, ausência de hifas; 1, de 1 a 10; 2, de 11 a 20; 3, de 21 a 30; 4, de 31 a 40; e 5, para mais de 40.

Figura 1 - Esquema da divisão da lâmina de vidro com os campos demarcados



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.3 Aderência de *C. albicans* à lamínulas de vidro

O estudo da capacidade de adesão de *C. albicans* foi realizado segundo Silva et al. (2010) e Menezes et al. (2013) com modificações. Para a análise da aderência, lamínulas de vidro foram colocadas em placas de cultura celular de 6 poços, e em seguida, adicionados 120 μL da suspensão padronizada de *Candida* e 2880 μL de meio BHI em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C durante 8 horas. Posteriormente, removeu-se o meio e as placas foram lavadas com água destilada estéril para a remoção das células não aderidas. As lamínulas foram coradas com 1% (v/v) de cristal violeta por 5 min, e posteriormente, lavadas novamente com água destilada estéril para remover o excesso de corante. Em seguida, as lamínulas foram colocadas sobre lâminas para visualização em microscópio óptico com aumento de 400x.

Foi feita a contagem de células aderidas a cada lamínula e a capacidade de adesão em material inerte foi classificada como negativa (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++). Em 30 campos analisados, a adesão celular foi considerada negativa quando menos de uma célula estava aderida por campo; fraca quando havia entre 1 a 10 células; moderada com adesão superior a 10 células em pelo menos 15 campos observados e forte quando foram contabilizadas 25 ou mais células aderidas por campo em pelo menos 15 campos observados.

As características de aderência de *Candida* às lamínulas de vidro também foram analisadas e classificadas: a) aderência difusa: quando as células de leveduras aderiram a toda a superfície da lamínula de vidro, sem formar grupos celulares; b) aderência localizada: quando envolveu grupos de leveduras aderidas à regiões localizadas da lamínula; c) aderência agregativa: caracterizada por grumos de leveduras que se arranjaram como “tijolos empilhados” ou “cachos de uva”; d) aderência filamentosa: formação de filamentos ou pseudo-hifas ao longo da superfície da lamínula.

3.6.4 Formação dos biofilmes de *C. albicans*

Os biofilmes foram formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Para isso, inicialmente foram inoculados 200 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans* (10^7 células/mL). A placa foi incubada a 37°C em agitação com rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) por 90 min para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após a fase de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço lavado duas vezes com PBS para remover as células não aderidas e adicionados 200 μ L de YNB acrescido de 100 mM de glicose. As placas foram tampadas e incubadas a 37°C em agitação com rotação de 75 rpm durante os tempos de 1h30 (adesão inicial), 6, 24 e 48 h. Após cada período de observação, os biofilmes foram quantificados por contagem de unidades formadoras de colônias para análise das células viáveis e por coloração pelo cristal violeta para análise da biomassa total.

3.6.4.1 Determinação do número de UFC/mL

Após o tempo de formação de cada grupo experimental, os biofilmes formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foram lavados com PBS e homogeneizados por 30 segundos utilizando-se

homogeneizador ultra-sônico com potência de 25 W para desprender o biofilme. A partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas, das quais alíquotas de 100 μL foram semeadas em placas com ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, EUA), que foram incubadas em estufa a 37°C por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

3.6.4.2 Quantificação do biofilme por Cristal Violeta

A quantificação da biomassa do biofilme foi realizada pelo método do Cristal Violeta, seguindo a metodologia descrita por Barbosa et al. (2016). Após os tempos de formação de biofilme, foi realizada lavagem com PBS de cada poço da placa de microtitulação e 200 μL de metanol a 99% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionados em cada poço para a fixação do biofilme. Passados 15 minutos, o metanol foi removido e a placa mantida em temperatura ambiente overnight (aproximadamente 16 horas). Após o período, 200 μL de cristal violeta (1% v/v) foi colocado nos poços e mantidos durante 20 minutos. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 μL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e acrescentado 200 μL de ácido acético para descoloração do biofilme. Então, 100 μL do sobrenadante do processo de descoloração foi transferido para placas de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm para medida da absorbância.

3.7 Estudo *in vivo* dos efeitos do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre a patogenicidade de *C. albicans* em modelo de *Galleria mellonella*

3.7.1 Infecção de *C. albicans* em *Galleria mellonella* e divisão dos grupos experimentais

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase de larva com peso corporal entre 250 a 300 mg criadas no Laboratório de Invertebrados do ICT/Unesp. Um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* (previamente exposta ao sobrenadante de *S. mutans*, caldo YPD ou caldo BHI) foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última prolegue esquerda.

Para os estudos em *G. mellonella*, também foram incluídos mais dois grupos controles, o primeiro recebeu o mesmo número de injeções recebidas pelos grupos experimentais. Cada injeção deste grupo controle conteve 10 µL de solução fisiológica (PBS) e o objetivo foi avaliar se mortes de *G. mellonella* ocorreram em virtude da injúria traumática causada pelas injeções ou pela técnica de manipulação do animal, ou seja, o grupo controlou a técnica utilizada pelo operador. O segundo grupo foi composto por larvas que não receberam injeção alguma. A finalidade deste último grupo foi controlar a remessa de *G. mellonella* utilizada no experimento. Em casos onde ao menos em um dos grupos controle tiveram 2 larvas mortas, o ensaio foi desconsiderado e um novo refeito.

Seringas Hamilton com capacidade de 10 µL (Hamilton Inc, EUA) foram utilizadas para as injeções. Antes da inoculação, as seringas utilizadas para as injeções foram esterilizadas com ácido peracético (Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foram executadas a cada 5 injeções. Para esta limpeza a seringa foi lavada em uma sequência de 4 tubos de ensaio contendo respectivamente: 1º) hipoclorito de sódio, 2º) álcool absoluto, 3º) água destilada estéril e 4º) PBS estéril. Em cada tubo, a agulha foi mergulhada e 7 movimentos no êmbolo da seringa para cima e para baixo foram executados. Após a injeção, as larvas foram armazenadas em recipientes plásticos e mantidas no escuro em estufa a 37°C.

Após a injeção de *C. albicans*, as larvas foram avaliadas por meio da curva de sobrevivência, contagem de UFC/mL de *C. albicans* e densidade hemocitária, conforme representado no Quadro 1.

Quadro 1 - Grupos experimentais e número de larvas de *G. mellonella* por experimento

Grupos Experimentais	<i>Galleria mellonella</i>		
	Curva de sobrevivência	Contagem de UFC/mL	Densidade hemocitária
<i>C. albicans</i> (Controle em YPD)	16	60	15
<i>C. albicans</i> (Controle em BHI)	16	60	15
<i>C. albicans</i> (sobrenadante)	16	60	15
PBS apenas	16	---	15
Sem injeção	16	---	---
TOTAL	320		

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7.2 Determinação da curva de sobrevivência de *Galleria mellonella*

Para esse experimento, as larvas foram inoculadas com suspensões de *C. albicans* em concentrações variando de 10^7 , 10^8 ou 10^9 células/mL, buscando-se avaliar a patogenicidade das suspensões e seleção da concentração mais adequada para os testes posteriores. Após as injeções, as larvas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A morte de todas as larvas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento.

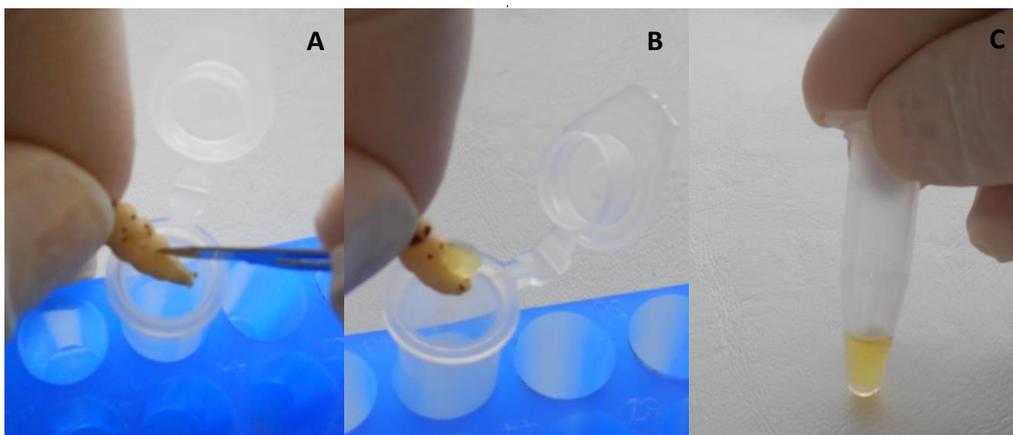
3.7.3 Estudo da cultura da hemolinfa - Contagem de UFC/mL de *C. albicans*

Para quantificar a presença de *C. albicans* na hemolinfa de *G. mellonella*, as larvas foram eutanasiadas nos tempos de 30 min, 4, 8 e 12 h após a infecção com suspensão de *C. albicans* na concentração de 10^8 células/mL, conforme os grupos experimentais do Quadro 1.

Para cada grupo e tempo foi utilizado um pool de 5 larvas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo foram utilizadas 60 larvas.

Nos tempos determinados, as larvas foram cortadas com lâmina de bisturi no sentido céfalo-caudal e espremidas para retirada da hemolinfa, que foi colocada em um eppendorf (Figura 2). A partir do pool da hemolinfa das larvas, foram feitas diluições seriadas e sementeiras em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo para *C. albicans*, ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol por mL de meio (Vixmicina, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h, e após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

Figura 2 - Técnica para a obtenção da hemolinfa de *G. mellonella*



Legenda: A) larva posicionada para retirada da hemolinfa. Incisão feita logo abaixo da última prolegue esquerda e posteriormente seguindo a linha mediana da larva até sua região caudal; B) hemolinfa sendo retirada após a incisão; C) tubo eppendorf com hemolinfa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7.4 Densidade hemocitária

Para cada grupo experimental, 5 larvas foram infectadas com *C. albicans* na concentração de 10^8 células/mL e incubadas a 37°C durante 12 h. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo foram utilizadas 15 larvas.

Para a coleta da hemolinfa as larvas foram imobilizadas em placa de Petri que foram colocadas previamente na geladeira por cerca de 20 min, em seguida foram cortadas com bisturi na parte ventral no sentido céfalo-caudal e espremidas para a retirada da hemolinfa que foi coletada em microtubos (Figura 2). A seguir, 20 µL de cada hemolinfa coletada foram diluídos em 180 µL de IPS (tampão anticoagulante estéril – 150 nM de cloreto de sódio, 5 nM de cloreto de potássio, 10 nM de tris-HCL PH 6,9, 10 nM de EDTA e 30 nM de citrato de sódio) em microtubo gelado. Para a contagem dos hemócitos 10 µL da diluição foram acrescentados e contados em hemocitômetro.

3.8 Análise estatística

Os dados dos testes de atividade proteolítica, biofilmes (UFC/mL e biomassa), contagem de *C. albicans* da hemolinfa e densidade hemocitária foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey. Para avaliação dos escores da filamentação foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. Nos experimentos de sobrevivência de *G. mellonella* foi realizada a curva de sobrevivência utilizando o método Kaplan-Meier e o nível de significância calculado através do teste Log-rank (Mantel-Cox). Em todos os testes será utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5%.

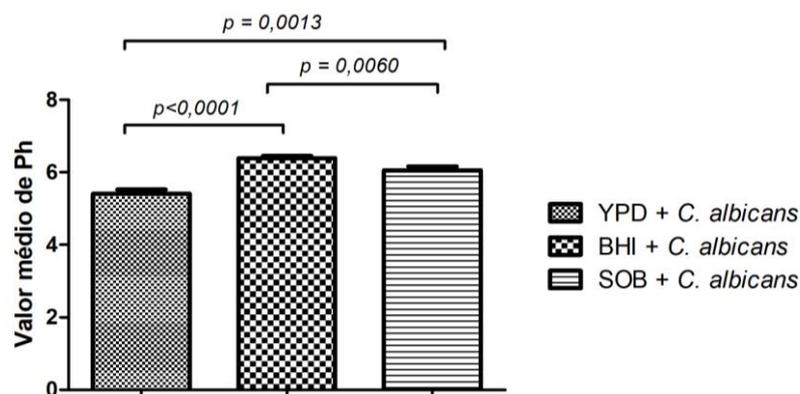
4 RESULTADO

4.1 Efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre o crescimento de *C. albicans*

Inicialmente, foi realizada a verificação do pH das culturas após o crescimento de *C. albicans* em contato com sobrenadante de *S. mutans*, caldo BHI ou caldo YPD. O objetivo desse experimento foi analisar a interferência da produção de ácidos que poderiam atuar sobre *C. albicans*, já que pH do meio (ácido) pode apresentar capacidade inibitória sobre a produção de hifas.

Após o cultivo de 24 h de *C. albicans* nos respectivos meios, foi verificado pH com média de 5,40, 6,39 e 6,06 para os grupos YPD, BHI e sobrenadante de *S. mutans*, respectivamente. Os resultados demonstraram que houve diferença estatística comparando todos os grupos estudados ($p < 0,0001$) (Figura 3), sendo o menor valor de pH encontrado no meio de cultura do crescimento de *C. albicans* no YPD (pH = 5,4). Já o meio do crescimento em sobrenadante e em BHI ficou próximo ao pH neutro (6,39 e 6,06, respectivamente).

Figura 3 - Valores de pH verificados após a cultura de 24 h de *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais

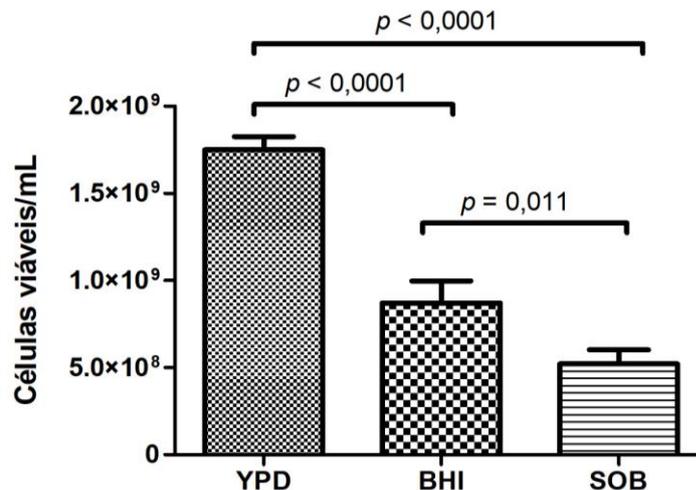


Legenda: Gráfico representando os valores de pH após crescimento de *C. albicans* em meio YPD, BHI e no sobrenadante de *S. mutans*, em cultura planctônica de 24 h. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida verificou-se na contagem em hemocitômetro que a média de células viáveis foi maior para o grupo em que *C. albicans* foi cultivada em YPD ($1,75 \times 10^9$ células/mL), seguida pelo cultivo em BHI ($8,7 \times 10^8$ células/mL) e pelo cultivo com sobrenadante de *S. mutans* ($5,2 \times 10^8$ células/mL) (Figura 4). Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos analisados ($p < 0,0001$), demonstrando que o meio seletivo para fungo (YPD) promoveu maior crescimento de *C. albicans* do que o meio BHI. No entanto, o crescimento em contato com o sobrenadante de *S. mutans* causou redução significativa do número de *C. albicans* comparado com ambos os grupos controle. Esses dados confirmaram que o sobrenadante de *S. mutans* é capaz de inibir o crescimento das células de *C. albicans* em cultura planctônica.

Figura 4 - Contagem de células viáveis/mL de *C. albicans* após crescimento de 24 h em contato com sobrenadante de *S. mutans*, caldo YPD ou caldo BHI



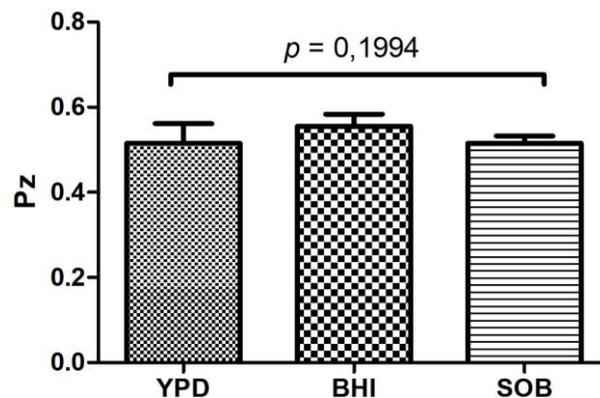
Legenda: Média e desvio-padrão da contagem em hemocitômetro de UFC/mL de *C. albicans* após crescimento em meio YPD, BHI e no sobrenadante de *S. mutans*, em cultura planctônica de 24 h. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0,05$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Estudo *in vitro* dos efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre os fatores de virulência de *C. albicans*

4.2.1 Determinação da atividade proteolítica extracelular

Em todos os grupos estudados, foi encontrada atividade fortemente positiva para produção de proteinases por *C. albicans*, com valores de Pz de 0,51 para o grupo YPD e grupo sobrenadante de *S. mutans*, e 0,55 para o grupo BHI (Figuras 5 e 6). Esses dados demonstraram que o cultivo de *C. albicans* em caldo YPD ou BHI não influenciou a atividade proteolítica, assim como o sobrenadante de *S. mutans* não reduziu a capacidade de *C. albicans* em produzir proteinase *in vitro*.

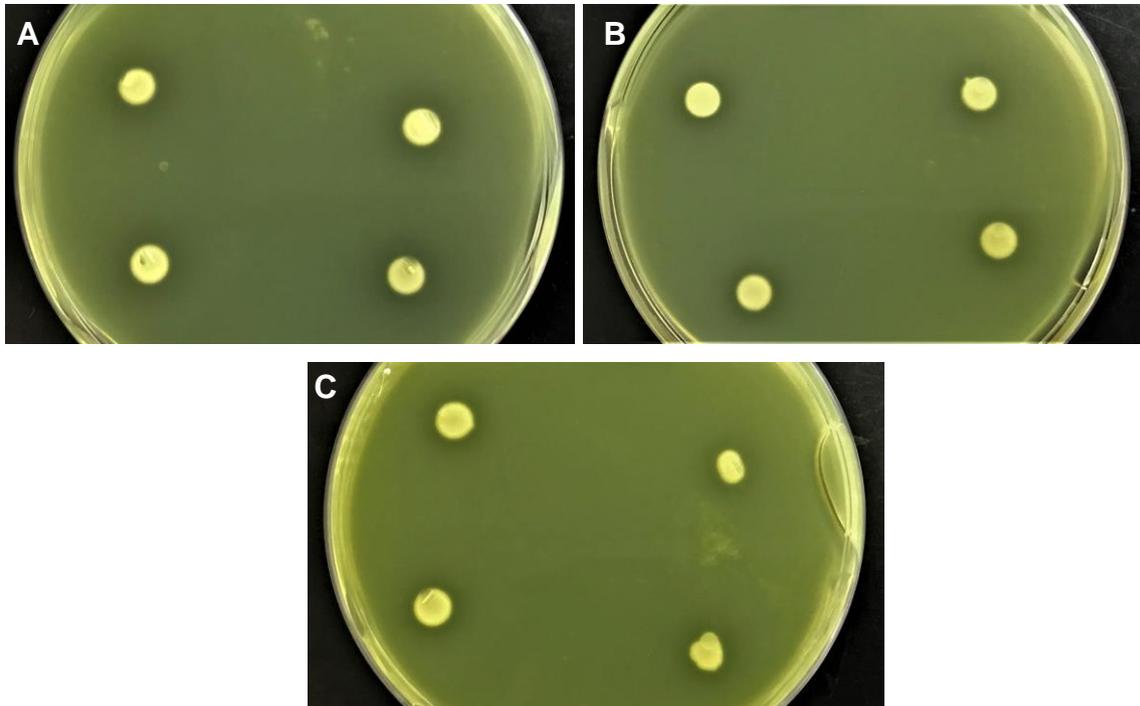
Figura 5 - Atividade proteolítica (Pz) de *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais



Legenda: Média e desvio-padrão dos valores de atividade proteolítica (Pz) para os diferentes grupos experimentais. Os resultados foram classificados em negativo ($Pz = 1$ cm), positivo ($0,64 \text{ cm} \geq Pz < 1$ cm) e fortemente positivo ($Pz < 0,64$ cm). Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Colônia de *C. albicans* com formação de halo claro em torno de cada colônia em Ágar proteinase, evidenciando a produção de Saps *in vitro*



Legenda: Placas de Ágar proteinase com colônia de *C. albicans* e formação de halo claro ao redor das colônias representando a degradação da albumina por proteinases, após crescimento do fungo em: A) YPD, B) BHI e C) Sobrenadante de *S. mutans*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

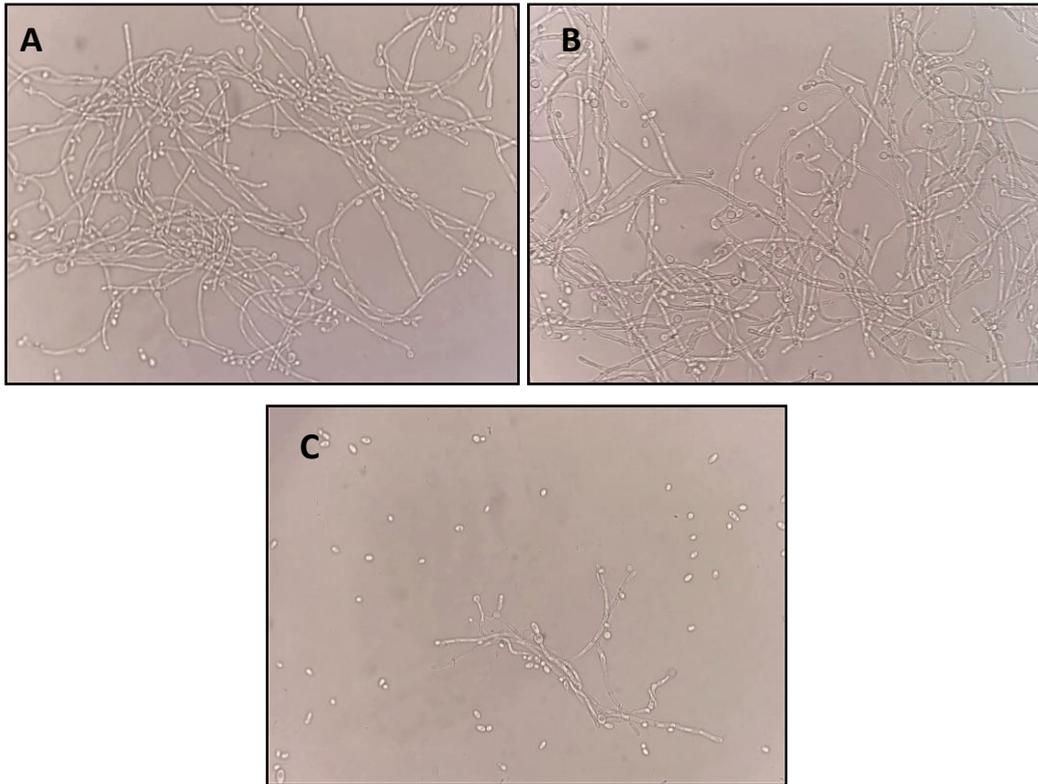
4.2.2 Filamentação de *C. albicans*

Nos grupos controle, nos quais *C. albicans* foi cultivada nos meios de cultura YPD ou BHI, foi observado intenso desenvolvimento de hifas (Figura 7A e B) comparado ao grupo de *C. albicans* em contato com sobrenadante de *S. mutans*, que mostrou poucas hifas com predomínio de células leveduriformes (Figura 7C). Esses dados demonstraram que o sobrenadante de *S. mutans* atuou na transição morfológica de *C. albicans* inibindo a formação de hifas.

O número de hifas presentes foi então quantificado, verificando-se que nos controles YPD e BHI, as medianas dos escores foram de 4,5 e 4,0 respectivamente. Entretanto, houve redução estatisticamente significativa no grupo em que *C. albicans* foi cultivada na presença do sobrenadante de *S. mutans*, com mediana dos escores

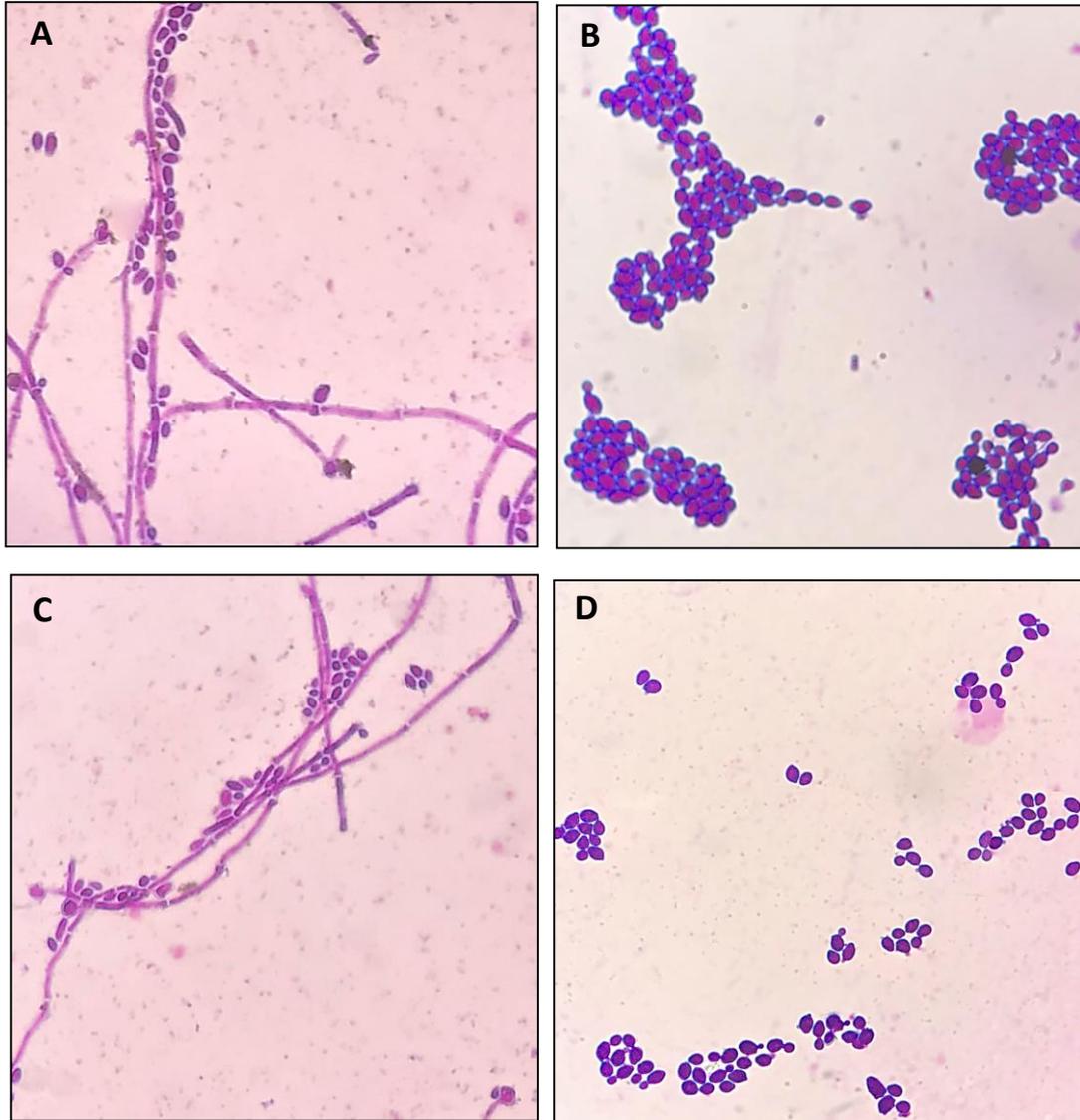
igual a 1 ($p = 0,0033$). Não foi observada diferença estatística entre os grupos controle YPD e BHI ($p = 0,0696$) (Figura 8).

Figura 7 - Imagens de microscopia óptica ilustrando a morfologia de *C. albicans*



Legenda: A) Grupo controle formado por *C. albicans* cultivada em caldo YPD demonstrando a presença de emaranhado de hifas; B) Grupo controle formado por *C. albicans* cultivada em caldo BHI também com presença de hifas e C) Grupo onde *C. albicans* foi cultivado no sobrenadante da cultura de *S. mutans*, com redução de hifas e presença de leveduras. Aumento original 400x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Imagens de microscopia óptica ilustrando o padrão de aderência e morfologia de *C. albicans*



Legenda: A e B) Grupo controle formado por *C. albicans* cultivada em caldo YPD demonstrando padrão de aderência filamentososa e agregativa, respectivamente; C) Grupo controle formado por *C. albicans* cultivada em caldo BHI também com presença de aderência filamentososa e D) Grupo em que *C. albicans* foi cultivada junto com o sobrenadante da cultura de *S. mutans*, demonstrando aderência difusa sem formação de hifas. Aumento original 400x.

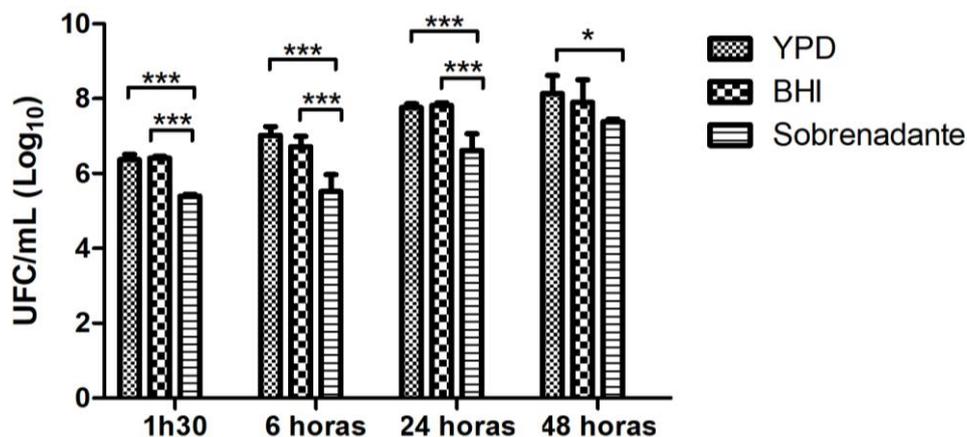
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Análise dos biofilmes de *C. albicans* por determinação do número de células viáveis (UFC)

Os biofilmes foram analisados em diferentes tempos de formação, buscando-se entender os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre o crescimento do biofilme de *C. albicans* desde a etapa de adesão inicial (1h30) até o estágio de maturação (48 h).

Após análise dos resultados, foi verificada redução nas contagens de UFC/mL de *C. albicans* quando esse fungo teve contato prévio com o sobrenadante de *S. mutans* em relação aos grupos controle (YPD e BHI). Essa redução ocorreu em todos os tempos de formação de biofilme estudados ($p = 0,0001$), sendo a maior redução observada no tempo de 6 h. Já a menor redução do crescimento de *C. albicans* causada pelo sobrenadante de *S. mutans* ocorreu no tempo de 48 h (Figura 10). Esses resultados demonstraram que a exposição ao sobrenadante de *S. mutans* prejudicou a capacidade de *C. albicans* em formar biofilmes, principalmente nos estágios iniciais de formação, e diminuiu conforme o biofilme sofreu maturação.

Figura 10 - Contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* em biofilmes formados *in vitro* nos diferentes tempos experimentais



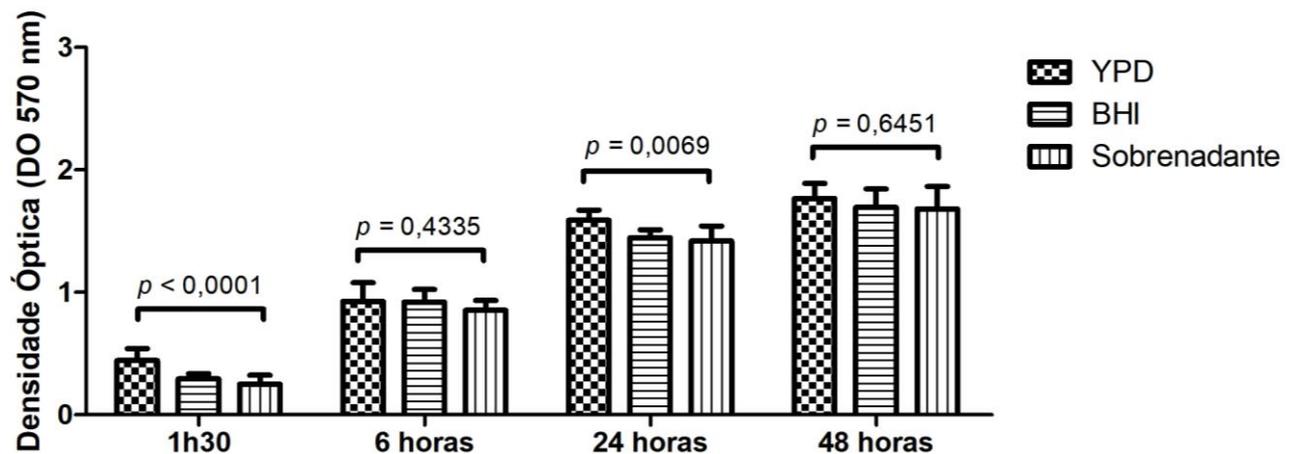
Legenda: Média e desvio-padrão da contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* após crescimento em meio YPD, BHI e no sobrenadante de *S. mutans* em biofilmes formados nos tempos de 1h30, 6, 24 e 48 h. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0,05$. * ($p < 0,05$) *** ($p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5 Análise dos biofilmes por quantificação da biomassa total

No teste de quantificação da biomassa total pela absorvância do cristal violeta, também foi verificada redução do biofilme de *C. albicans* no grupo do sobrenadante de *S. mutans* em relação aos grupos controles, principalmente durante a etapa de adesão inicial. Foi verificada uma maior leitura de densidade óptica nos grupos controle (YPD e BHI) em todos os tempos estudados, porém com diferença estatística apenas na adesão inicial (1h30) ($p < 0,0001$) e no tempo de 24 h ($p = 0,0069$) para o grupo controle YPD comparado com o controle BHI e sobrenadante de *S. mutans*. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos BHI e sobrenadante em nenhum dos tempos estudados (Figura 11). Esses dados indicam que pode não haver interferência do sobrenadante de *S. mutans* na biomassa total do biofilme de *C. albicans*, aparentemente apenas o meio de cultura YPD e BHI interferiu no resultado.

Figura 11 - Quantificação da biomassa total de *C. albicans* no teste de cristal violeta para os diferentes grupos experimentais



Legenda: Média e desvio padrão dos dados de biomassa total pelo teste de cristal violeta, obtidos nos biofilmes de 1h30, 6, 24 e 48 h para *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais. Teste ANOVA complementado com teste de Tukey, diferença estatística considerada significativa $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

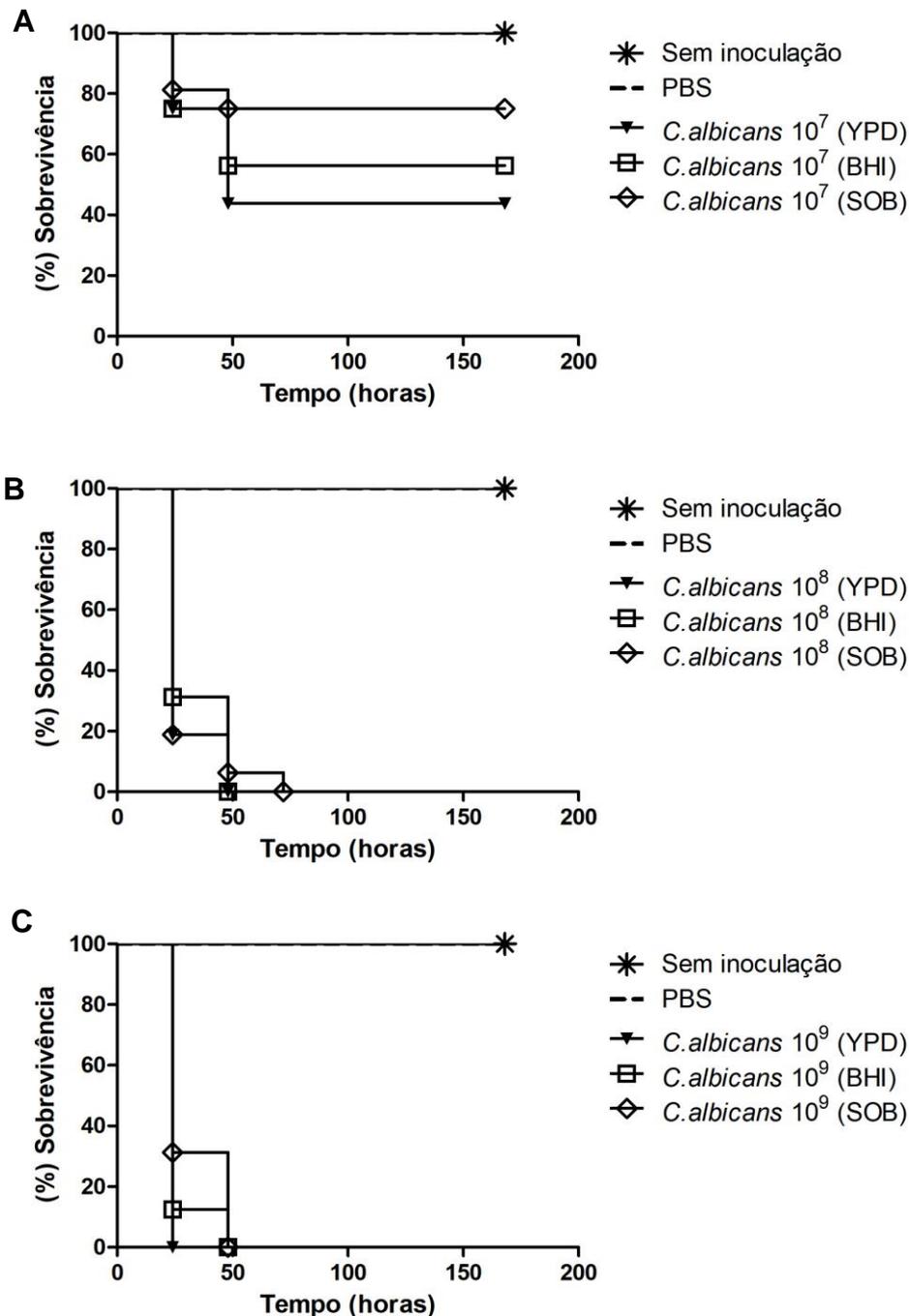
4.3 Estudo *in vivo* dos efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre *C. albicans*

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

Foi realizada a curva de sobrevivência de *G. mellonella* inoculada com *C. albicans* que foi cultivada em diferentes meios (YPD, BHI e no sobrenadante de *S. mutans*). Para essa avaliação, as larvas foram infectadas com diferentes concentrações do fungo: 10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL.

A menor taxa de morte foi encontrada na concentração de 10^7 céls/mL para o grupo sobrenadante com morte de 25% das larvas até o final do experimento, e com 56,25% e 43,75% de morte nos grupos controles YPD e BHI, respectivamente. Na concentração de 10^8 células/mL, foi obtida 100% de morte das larvas nas primeiras 48 h nos grupos controle (YPD e BHI) e em 72 h no grupo sobrenadante. Na concentração de 10^9 céls/mL foi observado 100% e 87,5% de morte das larvas nas primeiras 24 h para os grupos controle (YPD e BHI) contra 80% para o sobrenadante (Figura 12).

Figura 12 - Curva de sobrevivência de *G. mellonella* inoculada com *C. albicans*, previamente, cultivada em YPD, BHI ou sobrenadante da cultura de *S. mutans*. As larvas foram infectadas com 10^7 (A), 10^8 (B) e 10^9 (C) células/mL de *C. albicans*.



Legenda: Valores de p obtidos na análise de Log-rank/ Mantel-Cox ($p < 0,05$): A) Comparações entre os grupos YPD x BHI ($p = 0,5597$), YPD x SOB ($p = 0,1040$) e BHI x SOB ($p = 0,2959$). B) Comparações entre os grupos YPD x BHI ($p = 0,4216$), YPD x SOB ($p = 0,6839$) e BHI x SOB ($p = 0,7788$). C) Comparações entre os grupos YPD x BHI ($p = 0,1506$), YPD x SOB ($p = 0,0166$) e BHI x SOB ($p = 0,2067$).

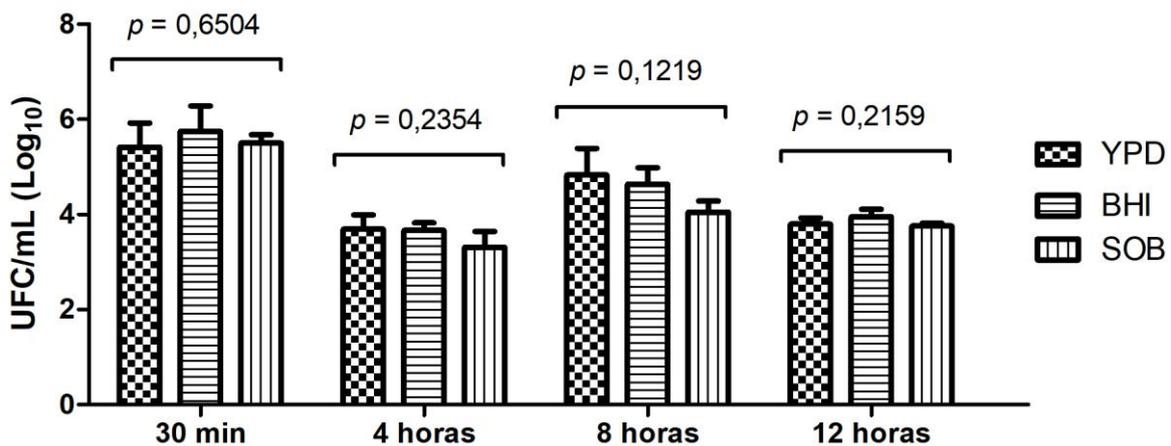
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL

Com o objetivo de quantificar a presença do fungo durante o processo infeccioso em *G. mellonella* foi realizada a contagem de UFC/mL na hemolinfa das larvas nos tempos de 30 min, 4, 8 e 12 h após a infecção de *C. albicans* com 10^8 células/mL.

O decorrer da infecção seguiu da mesma forma para todos os grupos, com decréscimo inicial no número de células de leveduras (de 30 min à 4 h), seguido por aumento no período de 8 h e decréscimo em 12 h. Em cada período de observação, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Embora não tenha sido observada diferença estatística, no tempo de 8 h houve redução do número de UFC/mL do grupo sobrenadante (4,049 UFC/mL Log_{10}) em relação aos grupos controle com YPD (4,831 UFC/mL Log_{10}) e BHI (4,634 UFC/mL Log_{10}) (Figura 13).

Figura 13 - Contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* para os diferentes grupos experimentais nos tempos de 30 min, 4, 8 e 12 h.



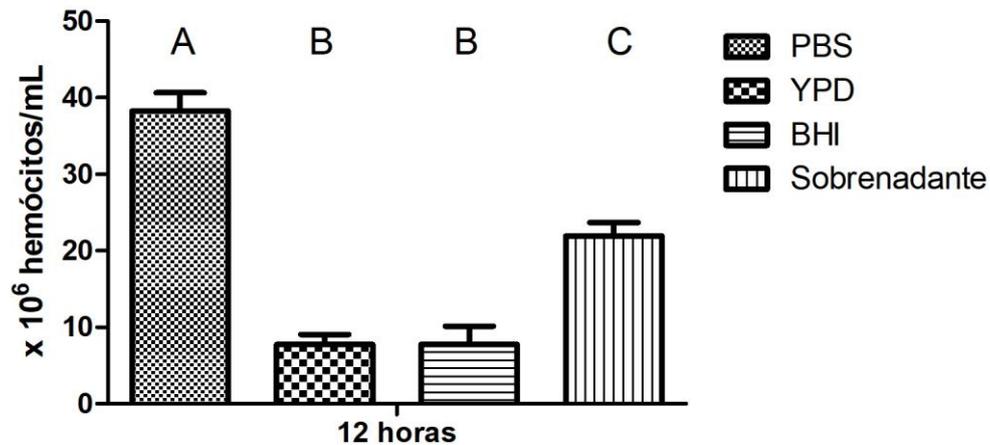
Legenda: Média e desvio-padrão da contagem de UFC/mL de *C. albicans* presente na hemolinfa das larvas de *G. mellonella*. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3 Densidade hemocitária

A realização da contagem de hemócitos presentes na hemolinfa das larvas após infecção com cepas de *C. albicans* cultivadas em YPD, BHI ou sobrenadante foi realizada após 12 h de infecção com *C. albicans* (10^8 células/mL). Foi verificada uma maior contagem hemocitária para as larvas inoculadas com a cepa cultivada no sobrenadante de *S. mutans*, com diferença estatística comparada aos grupos controle (Figura 14). Já, entre os grupos controle não foi verificada diferença estatisticamente significativa.

Figura 14 - Contagem de células hemocitárias presente na hemolinfa das larvas de *G. mellonella* após infecção por *C. albicans* no tempo de 12 horas



Legenda: Média e desvio-padrão da contagem de hemócitos na hemolinfa das larvas de *G. mellonella* após infecção por *C. albicans* no tempo de 12 horas. Letras diferentes indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

C. albicans é um fungo comensal colonizador natural da cavidade bucal (Krom et al., 2014; Sultan et al., 2018). No entanto, sob certas condições de imunossupressão ou mudanças no ambiente do hospedeiro, esse micro-organismo oportunista pode rapidamente fazer a transição para um patógeno causando uma variedade de infecções, como a candidose bucal (Jabra-Rizk et al., 2016). Já a bactéria *S. mutans* é considerada um dos principais agentes etiológicos da cárie dentária, este patógeno pode catalisar eficientemente a sacarose em glucanos extracelulares usando várias exoenzimas (glucosiltransferases ou Gtfs) (Kim et al., 2017). *S. mutans* e *C. albicans* são encontrados juntos em biofilmes na cavidade bucal, mas pouco se sabe sobre as interações ecológicas entre essas espécies, principalmente em relação aos efeitos dos produtos metabólicos envolvidos nessa interação. Embora, alguns autores já vem analisando a interação entre as células desses dois micro-organismos, este estudo tem como foco estudar a influência de produtos do metabolismo de *S. mutans* sobre os fatores de virulência de *C. albicans*.

De acordo com a literatura, a presença de *C. albicans* e *S. mutans* dentro de um mesmo nicho ecológico pode aumentar a aderência entre as células e, conseqüentemente, a formação do biofilme por essas duas espécies (Sztajer et al., 2014; Falsetta et al., 2014). Por outro lado, *S. mutans* também é capaz de liberar produtos que podem inibir o crescimento de outros micro-organismos pela produção de suas mutacinas (Kamiya et al., 2011). Já foi evidenciado que *S. mutans* produzem mutanobactina A, um peptídeo que pode atuar como molécula de sinalização e regular o crescimento e morfogênese de *C. albicans* (Jarosz et al., 2009; Joyner et al., 2010; Vílchez et al., 2010). O fato de *S. mutans* e *C. albicans* interagirem dentro de um mesmo biofilme promovendo o crescimento de ambos, enquanto modula a transição de leveduras para hifas de *C. albicans* precisa de maiores estudos, pois diversos fatores podem estar envolvidos.

Nesse estudo, avaliamos o efeito do sobrenadante de *S. mutans*, no qual retiramos as células e utilizamos apenas o caldo do meio de cultura (BHI) com os produtos metabólicos da bactéria, sobre o crescimento de *C. albicans*. Após isso, foi realizada cultura planctônica de *C. albicans* no sobrenadante de *S. mutans* ou em

meios de cultura YPD e BHI esterilizados (grupos controle). O caldo YPD foi utilizado como controle por ser um meio nutricionalmente rico empregado no cultivo de leveduras em condições não seletivas (Serrano-Fujarte et al., 2015). O caldo BHI também foi utilizado como controle por ser um meio de cultura enriquecido empregado no preparo do sobrenadante de *S. mutans*. Assim esse meio foi incluído nos testes para verificarmos sua possível interferência no crescimento do fungo.

Em nossos resultados, verificamos que o meio YPD promoveu maior crescimento de *C. albicans* do que o meio BHI. Tan et al. (2016) estudaram os meios YPD e BHI sobre o crescimento de algumas espécies de *Candida*, e após 24 h, todas as espécies formaram biofilmes em ambos os meios de cultura. *C. krusei* e *C. tropicalis* não demonstraram diferenças de crescimentos nos meios BHI e YPD. No entanto, houve interferência dos meios no crescimento de *C. parapsilosis*, pois quando cultivada em meio YPD, essa espécie manifestou formação de biofilme significativamente maior do que em BHI.

Independentemente do grupo controle utilizado nesse estudo (YPD ou BHI), o crescimento de *C. albicans* em contato com o sobrenadante de *S. mutans* levou a uma redução significativa no número de células de *Candida*. Esses dados indicaram a presença de metabólitos no meio de cultura, liberados por *S. mutans*, que provavelmente atuaram sobre as células fúngicas de forma a inibir seu crescimento. Uma análise mais aprofundada sobre a identidade e função de moléculas de sinalização presentes no sobrenadante de *S. mutans* ainda precisa ser realizada.

Em seguida, também, verificamos a presença de ácidos nos diferentes grupos experimentais por medição dos valores de pH. Sabe-se que uma série de condições afetam a morfologia de *C. albicans*, como por exemplo, em pH baixo (< 6), as células de *C. albicans* crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto que em pH alto (> 7) o crescimento de hifas é induzido (Davis, 2003; Mayer et al., 2013). Após o cultivo de 24 h de *C. albicans* nos diferentes meios de cultura, os resultados demonstraram diferenças estatísticas entre todos os grupos. O menor valor de pH ocorreu para o cultivo de *C. albicans* em YPD, já os valores de pH do crescimento em sobrenadante de *S. mutans* ou BHI ficaram próximos ao pH neutro. Demonstrando capacidade acidogênica e tolerância extrema aos ácidos, *C. albicans* já provou reduzir o pH de saliva suplementada com glicose até um valor de 3,2 pela secreção de ácidos orgânicos (Samaranayake et al., 1986; Klinke et al., 2009). Com isso, provavelmente,

a redução do pH verificada nos grupos deve-se à produção de ácidos por *C. albicans* durante as 24 h de crescimento.

O objetivo principal desse estudo foi avaliar os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre os principais mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*, podendo trazer futuramente novas alternativas terapêuticas. Devido à sua relevância clínica, os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* tem sido objeto de vários estudos ao longo dos anos. Fekete-Forgács et al. (2000) investigaram alterações dos fatores de virulência que acompanham o desenvolvimento de resistência ao fluconazol. Para isso, foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*: um isolado clínico sensível ao fluconazol e um mutante de laboratório resistente ao fluconazol derivado do primeiro. Para induzir resistência ao fluconazol, a cepa foi cultivada sucessivas vezes juntamente com o antifúngico. O mutante resistente ao fluconazol apresentou virulência aumentada em todos os fatores de patogenicidade avaliados, incluindo formação de tubo germinativo, capacidade de aderência, produção de proteinase e fosfolipase. Além disso, a virulência do mutante também foi maior em modelo de camundongo do que a cepa original. Assim, com o desenvolvimento da resistência ao fluconazol, não apenas um, mas vários fatores de virulência podem ser afetados, resultando em um aumento da patogenicidade *in vivo*. Em nosso estudo, queremos analisar se isso ocorre de maneira contrária, ou seja, se o crescimento de *C. albicans* no sobrenadante de *S. mutans* desencadeia alterações que resultem em diminuição de sua patogenicidade.

As leveduras do gênero *Candida* possuem capacidade em desenvolver diversos mecanismos de virulência de forma simultânea, cuja complexidade ainda precisa ser melhor investigada. O que já está bem estabelecido, é que para se estabelecer no hospedeiro, *C. albicans* precisa apresentar capacidade de adesão, filamentação, formação de biofilme e secreção de enzimas hidrolíticas (Andrade et al., 2017; Monteiro et al., 2014).

A capacidade de adesão, é um fator determinante principalmente no início da colonização. *C. albicans* possui capacidade de aderência às células do hospedeiro ou até mesmo a variados materiais inertes, como as próteses dentárias. A etapa de adesão é essencial para a sobrevivência desse gênero em hospedeiros humanos, promovendo sua colonização e infecção (Sardi et al., 2013; Núñez-Beltrán et al., 2017; Mellinghoff et al., 2018). No presente estudo, foi observado que em todas as condições

de crescimento avaliadas (sobrenadante de *S. mutans*, caldo YPD ou caldo BHI) *C. albicans* foi capaz de aderir-se fortemente à superfície de lamínulas de vidro. Entretanto, foram encontradas diferentes formas de organização celular entre os grupos, sendo nos grupos controle de *C. albicans* observado padrão de aderência agregativa, enquanto na cultura com o sobrenadante de *S. mutans* houve predomínio do padrão de aderência difusa. Assim, esses dados sugerem que os metabólitos de *S. mutans* podem interferir com o padrão de adesão e organização celular de *C. albicans*, e conseqüentemente, na sua capacidade de aderência aos tecidos.

De acordo com Menezes et al. (2013), o padrão do tipo localizado ou agregativo facilita a formação de biofilme, devido a presença de adesinas (proteínas Als) na parede celular de *Candida* que são responsáveis pela capacidade de aderência intercelular. A família de genes ALS codifica oito glicoproteínas de superfície celular (ALS1-7 e ALS9) relacionada a adesão a superfícies do hospedeiro, formação de biofilme e invasão tecidual (Ho et al., 2019). Os genes ALS2 e ALS3 são especialmente importantes, pois medeiam a adesão da levedura ao tecido do hospedeiro e também age na agregação entre as levedura (Hoyer et al., 2016; Bonfim-Mendonça et al., 2021).

A maioria dos microrganismos sobrevive na natureza por causa de seu estilo de vida comunitário que permite a formação de biofilmes (Donlan et al., 2002). Os biofilmes são comunidades microbianas ligadas à superfície biótica ou abiótica incorporadas em uma matriz exopolimérica constituída principalmente por carboidratos, hexosaminas, ácidos urônicos, proteínas e ácidos nucléicos (Rickard et al., 2003; Vu et al., 2009). A formação do biofilme começa com a adesão das células de levedura às superfícies, que crescem para gerar uma camada basal. As células da camada basal consistem em algumas hifas que se estendem para produzir uma camada superior que é quase exclusivamente de hifas. Conforme o biofilme amadurece, as células produzem a matriz extracelular consistindo principalmente de proteínas e carboidratos (Nobile et al., 2006). A manutenção da arquitetura do biofilme pode ser assegurada pela formação de canais e colunas, que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio para toda a comunidade microbiana (Mitchell et al., 2016).

A formação de biofilme é essencial para a proteção de leveduras contra mecanismos de defesa do hospedeiro e medicamentos antifúngicos comumente usados (Kojic et al., 2004). Portanto, a alteração na habilidade de formação do biofilme

pode influenciar significativamente na capacidade do fungo em causar doença. A formação do biofilme de *C. albicans* progride em três fases de desenvolvimento: fase inicial (0-11 h), fase intermediária (12-30 h) e maturação (31-72 h) (Tobudic et al., 2012). Com isso, nesse estudo os biofilmes foram analisados em diferentes tempos de formação, buscando-se entender os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre o crescimento do biofilme de *C. albicans* desde a etapa de adesão inicial (1h30) até o estágio de maturação (48 h). Após análise dos resultados, foi verificada redução nas contagens de células viáveis (UFC/mL) de *C. albicans* quando esse fungo teve contato prévio com o sobrenadante de *S. mutans* em relação aos grupos controle. Ocorreu redução em todos os tempos de formação de biofilme estudados em relação aos grupos controle, sendo a maior redução observada no tempo de 6 h. Esses resultados demonstraram que a exposição ao sobrenadante de *S. mutans* prejudicou a capacidade de *C. albicans* em formar biofilmes, principalmente nos estágios iniciais de formação.

Os biofilmes também foram analisados quanto a quantificação da biomassa total pela absorvância do cristal violeta. Este corante se liga a moléculas carregadas negativamente e polissacarídeos, corando tanto as células viáveis quanto as mortas de *Candida*, bem como a matriz extracelular (Peeters et al., 2008). Apesar de uma maior leitura de densidade óptica nos grupos controle (YPD e BHI) em todos os tempos estudados, houve diferença estatística apenas na adesão inicial (1h30) e no tempo de 24 h para o grupo controle YPD comparado com o controle BHI e sobrenadante de *S. mutans*. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos BHI e sobrenadante em nenhum dos tempos estudados. Portanto, embora o sobrenadante de *S. mutans* tenha reduzido o número de células viáveis de *C. albicans* no teste de contagem de UFC/mL, o mesmo não alterou a biomassa do biofilme de forma significativa. Assim, torna-se necessário maiores estudos para elucidar os mecanismos pelos quais os metabólitos de *S. mutans* agem sobre as células fúngicas e a matriz extracelular dos biofilmes.

Com o objetivo de investigar como *S. mutans* afeta *C. albicans*, Barbosa et al. (2016) também testaram os efeitos do filtrado da cultura de *S. mutans* em biofilmes de *C. albicans*. O filtrado da cultura de *S. mutans* foi capaz de inibir o número de UFC/mL de *C. albicans* e bloquear a formação de hifas, com ausência total de filamentação nos biofilmes analisados por microscopia eletrônica de varredura. Em

outro estudo, Santos e Fugisaki et al. (2020) extraíram e fracionaram o sobrenadante da cultura de *S. mutans*, obtendo-se apenas os compostos liberados pelo metabolismo da bactéria, com o objetivo de encontrar antifúngicos capazes de inibir *C. albicans*. O sobrenadante de *S. mutans* foi extraído via partição líquido-líquido e fracionados em coluna de sílica C-18, obtendo-se as frações do sobrenadante de *S. mutans* SM-F1 e SM-F2. Assim como no presente estudo, esses autores encontraram atividade anti-biofilme para ambas as frações, de maneira dependente da dose, além de verificarem ação inibitória na candidose bucal em camundongos

C. albicans é uma espécie dimórfica capaz de alternar a morfologia entre as formas de levedura e hifas, uma propriedade central para sua patogênese e capacidade de formar biofilmes (Wall et al., 2019). A capacidade de diferenciação entre as formas leveduriformes e as formas filamentosas tem relação direta com a invasão tecidual por facilitar a penetração no tecido do hospedeiro (Jacobsen et al., 2012), não sendo, contudo, essencial para a patogênese da *Candida* (Gow et al., 2002). Provavelmente, a forma filamentosa seja mais virulenta em razão da maior superfície de contato entre o micro-organismo e a área a ser infectada, embora as duas formas sejam frequentemente encontradas tanto como comensais quanto em processos infecciosos (Jacobsen et al., 2012).

Uma vez que a formação de hifas determina a virulência de *C. albicans* e medeia a invasão no tecido infectado, compostos com capacidade de inibir a filamentação tem sido alvo de pesquisas de novas terapias para a candidose. No presente estudo, foi verificada significativa redução no desenvolvimento de hifas de *C. albicans* cultivada em contato com sobrenadante de *S. mutans*, que apresentaram predomínio de células leveduriformes. Esses dados indicaram que o sobrenadante de *S. mutans* atuou na transição morfológica de *C. albicans*, inibindo a formação de hifas. Em estudo de Santos e Fugisaki et al. 2020, foi demonstrado que o extrato do sobrenadante de *S. mutans* foi capaz de reduzir a filamentação de *C. albicans* por regular negativamente os genes de filamentação CPH1, EFG1, HWP1 e UME6. Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Pereira-Cenci et al. (2008), que usando microscopia confocal de varredura a laser, observaram que *S. mutans* suprimiu a formação de hifas por *C. albicans* e enfatizaram que os efeitos de *S. mutans* na filamentação de *C. albicans* devem ser considerados em estudos de prevenção de candidose bucal.

Para alcançar a invasão tecidual, *C. albicans* também dispõe da capacidade de liberação de enzimas hidrolíticas, como lipases, fosfolipases e proteinases. No presente estudo, foi encontrada atividade fortemente positiva para produção de proteinases por *C. albicans* em todos os grupos estudados, o que indica que o sobrenadante de *S. mutans* não reduziu a capacidade de *C. albicans* em produzir proteinase *in vitro*. Assim como nesse estudo, Fernandes et al. (2018) verificaram que a produção de enzimas hidrolíticas pelos biofilmes de *C. albicans*, como proteinase, fosfolipase e hemolisinas não foram afetadas pelo farnesol, que também é um composto de origem microbiana.

Em seguida, os resultados *in vitro* foram investigados por meio de estudos *in vivo* através do modelo invertebrado de *G. mellonella*, que já vem sendo usado para estudar a virulência de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp, mostrando forte correlação com modelos de mamíferos (Mylonakis et al., 2005; Glavis-Bloom et al., 2012; Santos, Fugisaki et al., 2020).

Nesse modelo *in vivo*, foram realizadas infecções em *G. mellonella* com células de *C. albicans*, previamente, cultivadas no sobrenadante de *S. mutans* ou nos meios de cultura BHI e YPD (grupos controle). Foi encontrado aumento da sobrevivência das larvas inoculadas com *C. albicans* previamente expostas ao sobrenadante de *S. mutans*, indicando que possíveis metabólitos produzidos por *S. mutans* podem ter interferido na patogenicidade de *C. albicans*. Barbosa et al. (2016) foram os primeiros autores a estudar *in vivo* os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre *C. albicans* e encontraram resultados semelhantes através da análise de sobrevivência, demonstrando que a injeção concomitante com células de *C. albicans* e filtrado da cultura de *S. mutans* prolongou a taxa de sobrevivência das larvas quando comparada ao grupo controle que recebeu apenas injeção de *C. albicans*.

Santos e Fugisaki et al. (2020) também realizaram tratamento terapêutico com extrato do sobrenadante de *S. mutans* em *G. mellonella* infectada por *C. albicans*, verificando aumento da sobrevivência das larvas. Os autores estenderam esses resultados para um modelo murino de candidose bucal, no qual foi observado redução na colonização de *C. albicans* na cavidade bucal quando os animais foram tratados com o extrato de *S. mutans*. Em outro estudo, a análise do extrato do sobrenadante de *S. mutans* foi testada em isolados clínicos de *Candida*, incluindo cepas de *C. albicans* e não-*albicans* com diferentes suscetibilidades ao fluconazol (Alves et al.,

2021). Foi verificado que o extrato de *S. mutans* foi capaz de aumentar a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* e *C. glabrata* e inibir as células fúngicas na hemolinfa. Esses efeitos antifúngicos ocorreram tanto para as cepas sensíveis ao fluconazol quanto para as resistentes. Entretanto, as larvas infectadas por *C. krusei* não foram afetadas pelo extrato de *S. mutans*.

Além da curva de sobrevivência, no presente trabalho também foram avaliados os efeitos do sobrenadante de *S. mutans* sobre a carga fúngica na hemolinfa de *G. mellonella* em diferentes momentos da infecção. Durante o processo infeccioso, não houveram diferenças significativas no número de células de *C. albicans* entre os grupos analisados, no entanto no tempo de 8 horas foi verificado uma redução da carga fúngica em relação ao grupo controle. Esses dados demonstram que o sobrenadante de *S. mutans* não foi capaz de interferir significativamente no número de células de *C. albicans* recuperadas nos diferentes tempos da infecção, embora tenha reduzido a patogenicidade nos ensaios de curva de sobrevivência. Provavelmente, esse fato possa ser explicado pela redução da capacidade de filamentação de *C. albicans* quando exposta ao sobrenadante de *S. mutans*, conforme observado em nosso estudo *in vitro*. Graham et al. (2017) demonstraram o efeito da bacteriocina EntV de *E. faecalis* sobre a virulência de *C. albicans*, que apresentou atividade anti-hifa, mas sem causar lise celular. Esses autores destacaram que os compostos antifúngicos que visam os fatores de virulência de *C. albicans* são muito promissores, pois são menos propensos ao desenvolvimento de resistência microbiana.

Nesse trabalho, também foi analisada a resposta imunológica de larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* exposta ao sobrenadante de *S. mutans*. O sistema imune inato de *G. mellonella* exibe muitas semelhanças celulares e humorais com a resposta imune dos mamíferos. O sistema imunológico das larvas consiste principalmente de hemócitos, que possuem atividade fagocítica e desempenham um papel importante contra patógenos (Kavanagh et al., 2004; Sheehan et al., 2021). Gago et al. (2014) observaram uma redução no número de células hemocitárias em larvas inoculadas com *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* em comparação com larvas infectadas com *C. metapsilosis*. Foi verificado em análises histológicas que essas duas espécies desenvolveram pseudo-hifas durante a infecção, o que pode ter levado à morte da população fagocítica. No presente estudo, foi observado redução de

células hemocitárias para os grupos controles no tempo de 12 h, em contrapartida ao grupo sobrenadante que obteve aumento do número de hemócitos. Isso pode ser explicado também pelo fato do sobrenadante de *S. mutans* inibir a formação de hifas, diminuindo então sua capacidade de causar infecção e a morte das células hemocitárias.

Os resultados obtidos demonstraram que o sobrenadante de *S. mutans* conseguiu eliminar várias células de *C. albicans* e atenuar os fatores de virulência das células sobreviventes. Assim, esses resultados incitam a realização de pesquisas voltadas para a caracterização e isolamento dos metabólitos secretados por *S. mutans*, que poderão futuramente levar ao desenvolvimento de novos fármacos para as infecções fúngicas.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho concluiu-se que:

- a. As células de *C. albicans* expostas ao sobrenadante de *S. mutans* apresentaram diminuição nos mecanismos de virulência relacionados à aderência, filamentação e formação de biofilme.
- b. A exposição ao sobrenadante de *S. mutans* atenuou a patogenicidade *in vivo* de *C. albicans* no modelo experimental de *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS*

Alves MDS, Fugisaki LRDO, Dos Santos JD, Scorzoni L, Medina RP, Silva DHS, et al. Antifungal effects of *Streptococcus mutans* extract on *Candida* strains susceptible and resistant to fluconazole: an *in vivo* study. *Med Mycol*. 2021 Fev; myab008. doi: 10.1093/mmy/myab008

Alves F, Mima EGO, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2017 Mar 09;32:815-26. doi: 10.1007/s10103-017-2177-y

Andrade MCL, Oliveira MAS, Santos FDAGD, Vilela PDBX, Silva MN, Macêdo DPC, et al. A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *PLoS ONE*. 2017;12(11):e0188020. doi: 10.1371/journal.pone.0188020

Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*. 2017 Sep 05;216 Suppl 3: S445–51. doi: 10.1093/infdis/jix131

Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Alvarenga JA, Velloso MS, Prata MCA, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0150457. doi: 10.1371/journal.pone.0150457

Berlutti F, Catizone A, Ricci G, Frioni A, Natalizi T, Valenti P, et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are able to adhere and invade human gingival fibroblast cell line. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010 Oct;23:1253–60. doi: 10.1177/039463201002300430

Bonfim-Mendonça PDS, Tobaldini-Valério FK, Capoci IR, Faria DR, Sakita KM, Arita GS, et al. Different expression levels of ALS and SAP genes contribute to recurrent vulvovaginal candidiasis by *Candida albicans*. *Future microbiol*. 2021 Fev;16(4):211-9. doi: 10.2217/fmb-2020-0059

Brown AJ, Brown GD, Netea MG, Gow NA. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol*. 2014 Nov;22(11):614-22. doi: 10.1016/j.tim.2014.07.001

Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*. 2020 Jan;8(2):154. doi: 10.3390/microorganisms8020154

Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 2010 Jan;12:248–71. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Davis D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet*. 2003;44(1):1–7. PMID: 12819929

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:881–90. doi: 10.3201/eid0809.020063

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-81. doi: 10.1128/IAI.00087-14

Fekete-Forgács K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*. 2000 Dec;43(7-8):273-9. doi: 10.1046/j.1439-0507.2000.00587.x

Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, Barbosa DB. Virulence factors in *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* biofilms mediated by farnesol. *Indian J Microbiol*. 2018 Feb;58(2):138-45. doi: 10.1007/s12088-018-0714-4

Fox EP, Nobile CJ. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*. 2012 Nov;3:315-22. doi: 10.4161/trns.22281

Gago S, García-Rodas R, Cuesta I, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2014;5(2):278-85. doi: 10.4161/viru.26973

Geraldino TH, da Costa TMPS, Brunnquell CR, da Cunha NV, Micheletti P, Costa IC, et al. Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: Mini Revisão. *Biosaúde*. 2012;14(1):26-41

Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. *Adv Exp Med Biol*. 2012;710:11-7. doi: 10.1007/978-1-4419-5638-5_2; PMID: 22127881

Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:366-71. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00338-7

Gow NA, Van De Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):112-22.

Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(17):4507-12. doi: 10.1073/pnas.1620432114

- Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016;18:310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002
- Ho V, Herman-Bausier P, Shaw C, Conrad KA, Garcia-Sherman MC, Draghi J, et al. An amyloid core sequence in the major *Candida albicans* adhesin Als1p mediates cell-cell adhesion. *MBio.* 2019;10(5):e01766–19. doi: 10.1128/mBio.01766-19
- Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: a review of Als protein structure and function. *Front Microbiol.* 2016 Mar;7:280. doi: 10.3389/fmicb.2016.00280
- Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 2001;147(8):1997-2005. doi: 10.1099/00221287-147-8-1997
- Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(5):558-64. doi: 10.1016/S1079-2104(98)90291-8
- Jabra-Rizk MA, Kong E, Tsui C, Nguyen M, Clancy C, Fidel P, et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun.* 2016;84:2724–39. doi: 10.1128/IAI.00469-16
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(1):85-93. doi: 10.1586/eri.11.152
- Jarosz LM, Deng DM, Van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot. Cell.* 2009;8:1658-64. doi: 10.1128/EC.00070-09
- Joyner PM, Liu J, Zhang Z, Merritt J, Qi F, Cichewicz RH. Mutanobactin A from the human oral pathogen *Streptococcus mutans* is a cross-kingdom regulator of the yeast-mycelium transition. *Org Biom Chem.* 2010;8(24):5486-89.
- Kadosh D, Mundodi V. A Re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. *J Fungi.* 2020;6(1):13. doi: 10.3390/jof6010013
- Kamiya RU, Taiete T, Goncalves RB. Mutacins of *Streptococcus mutans*. *Braz J Microbiol.* 2011 Dec;42:1248-58. doi: 10.1590/S1517-83822011000400001
- Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28:101-12. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002
- Khoury ZH, Vila T, Puthran TR, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Melo MAS, et al. The role of *Candida albicans* secreted polysaccharides in augmenting *Streptococcus mutans* adherence and mixed biofilm formation: *In vitro* and *in vivo* studies. *Front*

Microbiol. 2020 Feb;11:307. doi: 10.3389/fmicb.2020.00307

Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14. doi: 10.1038/srep41332

Kim H, Kang SS. Antifungal activities against *Candida albicans*, of cell-free supernatants obtained from probiotic *Pediococcus acidilactici* HW01. *Arch Oral Biol.* 2019 Mar;99:113-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.006

Klinke T, Kneist S, de Soet J, Kuhlisch E, Mauersberger S, Förster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Res.* 2009;43:83-91. doi: 10.1159/000204911

Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(10):1200-12. doi: 10.1016/j.cmi.2019.04.024.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:255–67. doi:10.1128/CMR.17.2.255-267.2004

Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014;93:445–51. doi: 10.1177/0022034514521814

Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2016;374(8):794–5. doi: 10.1056/NEJMc1514201

Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(4):653–70. doi: 10.1128/MMBR.00024-07

Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78:510–43. doi: 10.1128/MMBR.00013-14

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Oct;16:19-31.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013 Oct;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913

Mellinghoff SC, Hartmann P, Cornely FB, Knauth L, Köhler F, Köhler P, et al. Analyzing candidemia guideline adherence identifies opportunities for antifungal stewardship. *Eur J Clin Microbiol.* 2018 Jun;37(8):1563-71. doi: 10.1007/s10096-018-3285-8

- Mello TP, Aor AC, Gonçalves DS, Seabra SH, Branquinha MH, Santos AL. Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*. *Biofouling*. 2016 Jun;32(7):737-49. doi: 10.1080/08927014.2016.1192610
- Menezes VM, Vale INF, Monteiro SG, Gonçalves LHB, Figueiredo PMS, Monteiro CA. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. *Rev Patol Trop*. 2013;42(3):289-300. doi: 10.5216/rpt.v42i3.26931
- Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. The extracellular matrix of fungal biofilms. *Adv Exp Med Biol*. 2016;931:21–35. doi: 10.1007/5584_2016_6
- Monteiro DR, Negri M, Silva S, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;114:410-2. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.10.027
- Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005;73:3842-50; doi: 10.1128/IAI.73.7.3842-3850.2005
- Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001;44(9-10):361-7. doi: 10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x
- Nishimoto AT, Sharma C, Rogers PD. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Feb;75(2):257-70. doi: 10.1093/jac/dkz400
- Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith Jr FJ, Yue F, Phan Q, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog*. 2006;2(7):e63. doi: 0.1371/journal.ppat.0020063
- Núñez-Beltrán A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. *Microb Pathog*. 2017 Jun;07:293-303. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.009
- Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S, et al. Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;28(4):743-52.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157–65. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010
- Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008;53(8):755–64. pmid:18395698. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.02.015

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Mar;8(5):340–9. pmid:20348933

Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules.* 2015 Mar;20(4):5286-98. doi: 10.3390/molecules20045286

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133–63. doi: 10.1128/CMR.00029-06

Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:979-86. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00117.x

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012;528521. doi: 10.1155 / 2012/528521

Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J Appl Microbiol.* 2017;122(1):201-11. doi: 10.1111/jam.13324

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003;11:94–100. doi: 10.1016/s0966-842x(02)00034-3

Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FDC, Velloso MDS, Fuchs BB et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling.* 2018;34(2):212-25. doi.org/10.1080/08927014.2018.1425402

Saliba F. Emerging fungal infections. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 2012;10:419-21. doi: 10.1586/eri.12.14

Samaranayake LP, Hughes A, Weetman DA, MacFarlane TW. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol.* 1986 May;15:251–4. doi: 10.1111/j.1600-0714.1986.tb00617.x

Santos CM, Pires MC, Leao TL, Hernandez ZP, Rodriguez ML, Martins AK, et al. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology.* 2016;162(7):1195-207. doi: 10.1099/mic.0.000302.

Santos JD, Fugisaki LRO, Medina RP, Scorzoni L, Alves MS, de Barros PP, Ribeiro FC, et al. *Streptococcus mutans* secreted products inhibit *Candida albicans* induced oral candidiasis. *Front Microbiol.* 2020;11:1605. doi: 10.3389/fmicb.2020.01605

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Gianinni MJM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013;62:10-24. doi:

10.1099/jmm.0.0450540

Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribol JL. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*. 2003;2(5):1053-60. doi: 10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003

Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Reyna-López GE, Martínez-Gámez MA, Vega-González A, Cuéllar-Cruz M. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. *BioMed Res Int*. 2015 Feb. doi: 10.1155/2015/783639

Sheehan G, Margalit A, Sheehan D, Kavanagh K. Proteomic profiling of bacterial and fungal induced immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *J Insect Physiol*. 2021;131:104213. doi: 10.1016/j.jinsphys.2021.104213

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol*. 2010;59:747-54. doi: 10.1099/jmm.0.017517-0

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiol*. 2011;19:241-7. doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003

Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(10):737–48. doi: 10.1038/nrmicro2636.

Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: a lesson in co-existence. *PLoS Pathog*. 2018;14:e1006719. doi: 10.1371/journal.ppat.1006719

Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J*. 2014 May;8(11):2256-71.

Tan Y, Leonhard M, Ma S, Schneider-Stickler B. Influence of culture conditions for clinically isolated non-*albicans* *Candida* biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2016 Nov;130:123-8. doi: 10.1016/j.mimet.2016.09.011

Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*. 2012 July;55(3):199-204. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x

Vílchez R, Lemme A, Ballhausen B, Thiel V, Schulz S, Jansen R, et al. *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *ChemBioChem*. 2010;11;1552–62. doi: 10.1002/cbic.201000086

Vu B, Chen M, Crawford R, Ivanova E. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*. 2009;14:2535-54. doi:

10.3390/molecules14072535

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019;11:1–6. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.001

Wang X, Du L, You J, King JB, Cichewicz RH. Fungal biofilm inhibitors from a human oral microbiome-derived bacterium. *Org Biomol Chem.* 2012 Dec;10(10): 2044-50. doi: 10.1039/C2OB06856G

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol.* 2016;7:2173. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173

Uppuluri P, Acosta Zaldívar M, Anderson MZ, Dunn MJ, Berman J, Lopez Ribot JL, et al. *Candida albicans* dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells. *MBio.* 2018;9(4):e01338–18. doi: 10.1128/mBio.01338-18