



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**NICOLE DE MELLO FIALLOS**

**BIOFILME *INTERKINGDOM* DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans***

**FORTALEZA-CE**

**2022**

NICOLE DE MELLO FIALLOS

BIOFILME *INTERKINGDOM* DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans*

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

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro.

FORTALEZA-CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a)

---

F464b Fiallos, Nicole.

Biofilme interkingdom de *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans* /  
Nicole Fiallos. – 2022. 118 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. *Candida albicans*. 3. Biofilme. 4. Fenotiazinas. 5.  
Periodontites periapicais. I. Título.

CDD 610

---

NICOLE DE MELLO FIALLOS

BIOFILME *INTERKINGDOM* DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia médica. Área de concentração: Biofilmes.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristiane Yumi Koga Ito  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Louise Morais Dornelas Figueira  
*University of Florida (UF)*

---

Prof. Dr. Marco Antônio de Freitas Clementino  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Ana Cristina e Mário  
A minha irmã, Daniela.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço à minha família mais querida: minha mãe Ana Cristina, meu pai Mário, minha irmã Daniela e ao meu avô Hyeron. Vocês me apoiaram, das mais variadas formas, minha trajetória acadêmica. Sempre torceram por mim e me aconselharam nas dificuldades. Jamais chegaria aqui sem vocês.

Agradeço a minha orientadora Rossana. No primeiro dia que te conheci, já virei sua admiradora. Como tenho orgulho de dizer que sou sua orientanda! Hoje, após os anos do doutorado, a senhora é cada vez mais um modelo de inspiração para mim, em todos os aspectos profissionais, políticos, culturais e pessoais.

Agradeço a todos os meus companheiros de laboratório, em especial Ana Luiza, Bruno, Exedito, Anderson, Jonathas e Vandbergue. Vocês transformaram os dias de trabalho em dias de partilha, os dias de dificuldade em dias de risadas. Torcerei sempre pelo sucesso de todos vocês!

Agradeço aos mestres Débora Castelo Branco, Fernanda Edna, Gláucia Guedes, Júlio Sidrim, Marcos Fábio e Sâmia Raimunda Brilhante. Todos vocês, de alguma forma, me fizeram crescer e querer me tornar uma profissional melhor.

Agradeço à Terezinha, que sempre com sua paciência e bom-humor me ajudou de todos os apuros! Admiro muito sua trajetória e sentirei falta das nossas tardes com café!

*Thanks to my foreign supervisors José Lemos, Jacqueline Abranches and Zeng Lin. You guided me in one of the most special years of my life. I will always be proud of being part of your team. You are the best!*

*Thanks to all my lab colleagues, Bruna, Louise, Alex, Debra, Kayle, Callaham, Adriana, Leila, Nicolas and Irene. It was so fun to work with you guys! Hope I will see you all soon.*

Agradeço aos membros da banca de qualificação pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento científico e tecnológico (FUNCAP).



(Neil Gaiman, *Sandman*, 1999)

## RESUMO

*Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* são importantes agentes das periodontites periapicais persistentes. Porém, o impacto que a interação entre esses dois micro-organismos tem sobre essas infecções ainda é pouco compreendido. O presente estudo objetivou: (1) otimizar e caracterizar biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*; (2) avaliar o efeito antimicrobiano de prometazina (PMZ) e clorpromazina (CPZ) sobre biofilmes duo-espécie; (3) investigar os efeitos dessa interação sobre a expressão gênica de *E. faecalis*. Para tanto, diferentes condições físico-químicas para a formação de biofilmes foram testadas. Ensaio de sensibilidade a antimicrobianos, composição bioquímica e análise ultraestrutural foram realizados. A sensibilidade de células planctônicas a PMZ, CPZ, clorexidina (CHX) e hipoclorito de sódio (NaClO) foram inicialmente analisadas. O efeito da interação entre as fenotiazinas e CHX sobre a atividade antimicrobiana em células planctônicas foi avaliada em ensaio de *chequerboard*. O efeito de NaClO, PMZ, CPZ, CHX, CHX+PMZ e CHX+CPZ em biofilmes foi investigado por ensaios de sensibilidade e análises bioquímicas e ultraestrutural. Análises de sequenciamento de RNA foram realizadas para comparar a expressão gênica de *E. faecalis* em biofilmes monoespécie e duo-espécie. Os achados dessa análise foram em seguida validados por ensaios complementares. Os resultados foram avaliados através de *One-way ANOVA* e *Turkey's multiple comparison test*. Biofilmes duo-espécie reproduzíveis foram estabelecidos em meio BHI a 35 °C por 48 h, em atmosfera de microaerofilia. Observou-se aumento no conteúdo de biomassa e quitina nos biofilmes tratados com vancomicina, o que pode se relacionar com a virulência de *C. albicans*. Análises estruturais revelaram que os biofilmes duo-espécie foram formados por células bacterianas e fúngicas aderidas ao substrato. PMZ, sozinha ou em combinação com CHX, foi a fenotiazina mais eficaz contra os biofilmes. PMZ e CPZ não foram capazes de aumentar a atividade antimicrobiana de CHX. A presença de *C. albicans* aumentou significativamente a expressão de genes de *E. faecalis* relacionados com o Sistema de Transportadores fosfoenolpiruvato (PTS). O aumento da atividade de PTS para absorção de manose na presença de *C. albicans* foi confirmada experimentalmente, assim como o seu efeito estimulante sobre a formação de biofilmes de *E. faecalis*. O modelo de biofilme proposto pode ser útil para o estudo de interações *interkingdom* e ajudar na busca por novas estratégias contra infecções periapicais. Pesquisas futuras investigando as propriedades de interesse clínico de PMZ a fim de sugerir seu uso na prática endodôntica. Não foi detectado sinergismo entre CHX e as fenotiazinas. A presença de *C. albicans* induz mudanças metabólicas que podem beneficiar a virulência de *E. faecalis* como patógeno endodôntico.

**Palavras-chave:** *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Biofilme. Fenotiazinas. Periodontites periapicais. *Interkingdom*.

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* are important agents of persistent apical periodontitis. However, the impact that the interaction between them has on these infections is still poorly understood. The present study aimed to (1) optimize and characterize *E. faecalis* and *C. albicans* dual-species biofilms; (2) evaluate the antimicrobial potential of promethazine (PMZ) and chlorpromazine (CPZ) against the dual-species biofilm; (3) investigate the outcomes that this interkingdom interaction may have on *E. faecalis*' gene expression. Therefore, different physicochemical conditions for biofilm formation were tested. Susceptibility assays to antimicrobials, biochemical composition and ultrastructure analyses were performed. The susceptibility of planktonic cells to PMZ, CPZ, chlorhexidine (CHX), and sodium hypochlorite (NaClO) was investigated. The effect of the interaction between phenothiazines and CHX on antimicrobial activity against planktonic cells was examined by checkerboard assay. The effect of NaClO, PMZ, CPZ, CHX, PMZ + CHX, and CPZ + CHX on dual-species biofilms was investigated by susceptibility assays and biochemical and ultra-morphological analyses. RNAseq analyses were performed to compare the gene expression of *E. faecalis* in mono-species and dual-species biofilms. Further assays to confirm the transcriptomics findings were performed. Results were evaluated through the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test. Reproducible dual-species biofilms were established in BHI medium, at 35°C for 48 h in a microaerophilic atmosphere. An increase in biomass and chitin content was detected after vancomycin treatment, which might be related to *C. albicans*' virulence. Structural analysis revealed that the dual-species biofilm was formed by both microorganisms adhering to the substrate. PMZ, alone or in combination with CHX, was the most efficient phenothiazine against biofilms. Neither PMZ nor CPZ increased the antimicrobial activity of CHX. The presence of *C. albicans* considerably upregulated *E. faecalis*' phosphoenolpyruvate transport system (PTS) gene expression. The increase of PTS activity for mannose uptake in the presence of *C. albicans* was confirmed experimentally, as well as the significant effect that mannose uptake has on the biofilm formation by *E. faecalis*. The proposed protocol could be useful for the study of interkingdom relationships and help to find new strategies against periapical infections. Studies investigating the clinical properties of PMZ should be performed to recommend their use in endodontics. No synergism was detected between CHX and the phenothiazines. The present study suggests that the presence of *C. albicans* induces metabolic changes that may

benefit *E. faecalis*' virulence as an endodontic pathogen.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Biofilm. Phenothiazines. Periapical periodontitis. *Interkingdom*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Evolução clínica das infecções endodônticas.....	26
Figura 2	Identificação laboratorial de <i>Enterococcus</i> sp.....	30
Figura 3	Identificação laboratorial de <i>C. albicans</i> .....	33
Figura 4	Efeitos da interação de <i>E.faecalis</i> e <i>C.albicans</i> previamente descritos na literatura.....	36
Figura 5	Organograma da estruturação experimental da parte I do presente estudo.....	45
Figura 6	Organograma da estruturação experimental da parte II do presente estudo.....	50
Figura 7	Organograma da estruturação experimental da parte III do presente estudo.....	55
Figura 8	Biomassa do biofilme duo-espécie e dos biofilmes monoespécie crescidos em sobre diferentes condições: meio de cultura, temperatura e período de incubação.....	67
Figura 9	Avaliação das unidades formadoras de colônia (ufc) dos biofilmes duo-espécie e monoespécie.....	68
Figura 10	Biofilme duo-espécie de <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i> formandos sob diferentes protocolos.....	69
Figura 11	Avaliação da sensibilidade antimicrobiana do biofilme duo-espécie a anfotericina B (AMB) e vancomicina (VAN).....	71
Figura 12	Conteúdo normalizado de quitina pelo controle do biofilme duo-espécie após tratamento com anfotericina B (AMB) e vancomicina (VAN).....	72
Figura 13	Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	73
Figura 14	Imagens de microscopia confocal a laser de varredura (MCLV) dos biofilmes duo-espécie.....	74
Figura 15	Contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de <i>E. faecalis</i> (A), <i>C. albicans</i> (B) e biomassa (C) do biofilme duo-espécie. Biofilmes duo-espécie maduros foram tratados por 10 minutos com PBS como controle (c) ou com soluções teste, como descrito a seguir: NaClO (25 mg ml <sup>-1</sup> ); CHX (20 mg	

	ml <sup>-1</sup> ); PMZ (1.28 mg ml <sup>-1</sup> ); CPZ (0.5 mg ml <sup>-1</sup> ); PMZ+CHX (0.08 mg ml <sup>-1</sup> + 0.02 mg ml <sup>-1</sup> ); CPZ (0.5 mg ml <sup>-1</sup> ) CPZ+CHX (0.125 mg ml <sup>-1</sup> + 0.02 mg ml <sup>-1</sup> ).....	76
Figura 16	Imagens de Microscopia confocal a laser de varredura (MCLV) do biofilme duo-espécies biofilme após o tratamento por 10 minutos com Salina (A); 25 mg ml <sup>-1</sup> NaClO (B); 20 mg ml <sup>-1</sup> CHX (C); 1.28 mg ml <sup>-1</sup> PMZ (D); PMZ+CHX, 0.08 mg ml <sup>-1</sup> + 0.02 mg ml <sup>-1</sup> (E); 0.5 mg ml <sup>-1</sup> CPZ (F); CPZ + CHX, 0.125 mg ml <sup>-1</sup> + 0.02 mg ml <sup>-1</sup> (G).....	78
Figura 17	Conteúdo normalizado de Quitina (A), carboidratos (B) e proteínas (C) dos biofilmes duo-espécie após tratamento de 10 minutos com solução salina (Controle), 25 mg ml <sup>-1</sup> NaClO; 20 mg ml <sup>-1</sup> CHX; 1.28 mg ml <sup>-1</sup> PMZ; PMZ+CHX, 0.08 mg ml <sup>-1</sup> + 0.02 mg ml <sup>-1</sup> ; 0.5 mg ml <sup>-1</sup> CPZ; CPZ + CHX, 0.125 mg ml <sup>-1</sup> + 0.02 mg ml <sup>-1</sup> .....	79
Figura 18	Análise de RNAseq de genes diferentemente expressos por <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>wild-type</i> em biofilme duo-espécie em relação ao biofilme monoespécie formados por 48h.....	81
Figura 19	Curvas de crescimento da cepas <i>wild type</i> (WT), Tn::10019, Tn::10020 e Tn::10021 de <i>E. faecalis</i> OG1RF crescidas em meio CDM contendo como única fonte de carboidrato Glicose (A), Manose(B) ou Frutose (C) incubadas em <i>Bioscreen C</i> a 37°C por 18h.....	83
Figura 20	Concentração de glicose (A) e índices de pH (B) dos sobrenadantes dos biofilmes monoespécie e duo-espécie. Os biofilmes monoespécie foram formados com <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>wild-type</i> (WT) e <i>C. albicans</i> SC5134 (C.a) em meio BHI+20mM glicose, sob atmosfera de 5% CO <sub>2</sub> a 35°C por 48h.....	84
Figura 21	Contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de <i>E. faecalis</i> (B,C) <i>C. albicans</i> (F,G) e biomassa (A,D,E) dos biofilmes monoespécie e duo-espécie. Os biofilmes mono- espécie foram formados com <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>wild-type</i> (A,B) e <i>C. albicans</i> SC5134 (E,F) em meio BHI+20mM glicose, CDM+20mM glicose, CDM+20mM manose, CDM+10mM glicose+10mM	

	manose sob atmosfera de 5% CO <sub>2</sub> a 35°C por 48h.....	85
Figura 22	Atividade de transportadores PTS dependente de fosfoenolpiruvato para Manose (A) e Frutose (B) de biofilmes monoespécie e duo-espécie.....	86
Figura 23	Ensaio de infecção em <i>G. mellonella</i> . Probabilidade de sobrevivência das larvas após infecção com <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>wild-type</i> . <i>C. albicans</i> SC5134 <i>Wild-type</i> , <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>wild-type</i> + <i>C. albicans</i> SC5134 <i>wild-type</i> .....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Sequência de Nucleotídeos para <i>Primers</i> utilizados para a confirmação da inserção dos <i>transposons</i> na região dos genes de interesse.....	43
Tabela 2	- Reações de PCR para a confirmação da inserção do <i>transposon</i> .....	44
Tabela 3	Concentrações Inibitórias Mínimas e Índice de Concentração Inibitória fracionária.....	75
Tabela 4	Listas de genes relacionados com transportadores PTS que apresentaram expressão aumentada em <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>wild-type</i> em biofilme duoespécie em relação ao biofilme monoespécie.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Caldo Infusão cérebro coração
CDM	<i>Chemically defined medium</i>
CCR	Sistema repressor de catabolismo de carboidratos
CHX	Digluconato de clorexidina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CPZ	Clorpromazina
EDTA	Ácido etildiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da America
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
L-LDL	L-lactato desidrogenase
MCLV	Microscopia Confocal a Laser de Varredura
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaClO	Hipoclorito de Sódio
OD	Densidade óptica
PAI	Ilhas de Patogenicidade
PBS	Solução Tampão Fosfato salina
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PEP	Sal monopotássico de ácido fosfoenolpirúvico
PMZ	Prometazina
PTS	Sistema transportador fosfoenolpiruvato
PYR	<i>L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide</i>
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TAE	Solução tampão de Tris, ácido acético e EDTA
UFC	Unidades formadoras de colônia

VAN Vancomicina  
VRE *Vancomycin Resistant Enterococci*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	24
2.1	Infecções endodônticas e periodontites periapicais.....	24
2.2	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	26
2.3	<i>Candida albicans</i> .....	31
2.4	Interação <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Candida albicans</i> .....	34
2.5	Irrigantes endodônticos.....	36
3	HIPÓTESES .....	39
4	OBJETIVOS.....	40
4.1	Objetivos gerais .....	40
4.2	Objetivos específicos .....	40
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	41
5.1	Locais de estudo .....	41
5.2	Cepas e cultivo.....	41
5.3	Preparação das cepas mutantes de <i>E.faecalis</i> OG1RF.....	
5.4	Organograma experimental.....	41
5.5	Parte experimental I.....	45
5.5.1	<i>Formação dos biofilmes</i> .....	47
5.5.2	<i>Ensaio de Cristal Violeta para quantificação da Biomassa</i> .....	47
5.5.3	<i>Contagem de unidades formadoras de colônia</i> .....	47
5.5.4	<i>Morfologia ultraestrutural</i> .....	48
5.5.5	<i>Composição bioquímica dos biofilmes duo-espécie</i> .....	48
5.5.6	<i>Resistência antimicrobiana do biofilme duo-espécie</i> .....	49
5.6	Parte experimental II .....	50
5.6.1	<i>Ensaio de sensibilidade antimicrobiana contra crescimento planctônico</i> ....	50
5.6.2	<i>Ensaio de “Chequerboard” de clorexidina com as fenotiazinas prometazina e clorpromazina</i> .....	51
5.6.3	<i>Formação de biofilme</i> .....	51
5.6.4	<i>Ensaio antibiofilme</i> .....	52
5.6.5	<i>Ensaio de Contagem de Unidades Formadoras de Colônia</i> .....	53
5.6.6	<i>Ensaio de Cristal violeta</i> .....	53

5.6.7	<i>Microscopia confocal a laser</i> .....	54
5.6.8	<i>Composição bioquímica dos biofilmes</i> .....	54
5.7	<b>Desenho experimental parte III</b> .....	55
5.7.1	<i>Formação dos biofilmes</i> .....	55
5.7.2	<i>Sequenciamento de RNA</i> .....	56
5.7.2.1	<i>Extração de RNA</i> .....	56
5.7.2.2	<i>Quantificação e diluição das amostras de RNA para análise</i> .....	58
5.7.2.3	<i>Sequenciamento de RNA</i> .....	58
5.7.2.4	<i>Análise dos dados do sequenciamento de RNA</i> .....	58
5.7.3	<i>Ensaio de monitoramento de crescimento com restrição de carboidratos</i> ....	59
5.7.4	<i>Ensaio da influência da manose na formação dos biofilmes</i> .....	60
5.7.5	<i>Ensaio de atividade dos transportadores PTS manose/frutose</i> .....	61
5.7.6	<i>Quantificação de glicose e mensuração de pH dos biofilmes</i> .....	62
5.7.7	<i>Ensaio de infecção in vivo em invertebrado <u>Galleria mellonella</u></i> .....	62
5.8	<b>Análise Estatística</b> .....	64
6	<b>RESULTADOS</b> .....	65
6.1	<b>Parte I</b> .....	65
6.1.1	<i>Formação do biofilme</i> .....	65
6.1.2	<i>Resistência antimicrobiana e composição bioquímica do biofilme duo-espécie</i> .....	70
6.1.3	<i>Morfologia ultra-estrutural</i> .....	72
6.2	<b>Parte II</b> .....	75
6.2.1	<i>Efeito das fenotiazinas contra células planctônicas de <u>E. faecalis</u> e <u>C. albicans</u></i> .....	75
6.2.2	<i>Efeito das fenotiazinas contra o biofilme duo-espécie</i> .....	75
6.2.2.1	<i>Ensaio de Contagem de Unidades Formadoras de colônia e Cristal Violeta</i>	75
6.2.2.2	<i>Microscopia Confocal a laser</i> .....	77
6.2.2.3	<i>Composição bioquímica</i> .....	79
6.3	<b>Parte III</b> .....	80
6.3.1	<i>RNAseq</i> .....	80
6.3.2	<i>Ensaio Bioscreen de monitoramento de crescimento com restrição de carboidratos</i> .....	83
6.3.3	<i>Quantificação de glicose e mensuração de pH dos</i>	84

	<i>biofilmes</i> .....	
6.3.4	<i>Influência de Glicose e Manose na formação dos biofilmes</i> .....	85
6.3.5	<i>Influência de <u>C. albicans</u> na atividade dos transportadores PTS de <u>E. faecalis</u></i> .....	86
6.3.6	<i>Ensaio de infecção in vivo em invertebrado <u>Galleria mellonella</u></i> .....	87
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	88
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	99
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	100
	<b>APÊNDICE A-Quantificação do conteúdo de carboidratos por Safranina e Vermelho de Congo e quantificação de proteínas por SYPRO RUBY</b> .....	114
	<b>APÊNDICE B- Imagens de Microscopia Eletrônica de varredura e Microscopia confocal a laser de biofilmes duo-espécie formados em caldo BHI, por 48 h, a 37 °C, em microaerofilia</b> .....	115
	<b>APÊNDICE C – Artigo publicado na <i>Biofouling</i>, em junho de 2022</b> .....	116
	<b>APÊNDICE D – Artigo publicado na <i>Antibiotics</i> em novembro de 2022</b> ..	117
	<b>APÊNDICE E- Artigo em confecção para submissão</b> .....	118

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades microbianas dinâmicas, de estrutura tridimensional aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, cujas células encontram-se circundadas por uma matriz extracelular polimérica (CIOFU et al., 2022; RAMAGE et al., 2012). Infecções mediadas por biofilmes envolvem uma grande variedade de sítios no corpo humano, incluindo epiderme, derme, trato gastrointestinal, sistema cardiovascular, tecido musculoesquelético, trato urogenital, vias aéreas e sistema nervoso central (CIOFU et al., 2022). Condições clínicas relacionadas com a presença de biofilme incluem feridas crônicas, osteomielites, endocardites, sinusites, fibrose císticas, cáries, periodontites, infecções dos canais radiculares, infecções urinárias, meningites, ceratites e sepse (LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014). Essa forma de colonização microbiana tem sido extensamente descrita na literatura como responsável por aumento de tolerância e resistência contra antimicrobianos (BRAUNER et al., 2016).

Nesse cenário clínico de doenças infecciosas induzidas por comunidades sésseis, inclui-se os biofilmes multiespécie (denominados polimicrobianos ou mistos), que comportam mais de uma espécie de micro-organismo em um mesmo biofilme. Quando comparados com monoculturas, biofilmes multiespécie têm sido relacionados com aumento da tolerância a antimicrobianos e da virulência (KRÜGER et al., 2019). Entre os biofilmes multiespécie, pode-se observar interações *interkingdom prokaryota-eukaryota*, que envolvem bactérias e fungos (BOWEN et al., 2018).

A cavidade oral é considerada um dos sítios do corpo humano com maior diversidade de espécies microbianas em seus biofilmes, tanto no contexto de microbioma como no contexto de doença, apresentando uma complexa rede de interações entre espécies bacterianas e fúngicas (MARSH; ZAURA, 2017). Por isso, doenças orais infecciosas como cáries, mucosites e periodontites são predominantemente de natureza polimicrobiana (BOWEN et al., 2018). Em indivíduos saudáveis, a saliva, a renovação epitelial e o sistema imune do hospedeiro mantêm a colonização microbiana oral sob controle, e a interação que predomina entre as diferentes espécies colonizadoras é a de competição. Por outro lado, a insuficiência desses mecanismos controladores aliados a instauração de disbiose na cavidade oral possibilita o desenvolvimento de doenças orais infecciosas, onde as espécies colonizadoras podem desenvolver uma interação de protocooperação para invasão dos

tecidos do hospedeiro (KOO; ANDES; KRYSAN, 2018).

Periodontites periapicais são doenças inflamatórias nos tecidos periapicais induzidas pela presença de biofilmes polimicrobianos no interior dos canais radiculares dentários, ocasionando reações inflamatórias que resultam na destruição do periodonto (NAIR et al., 2005; SAKKO; TJÄDERHANE; RAUTEMAA-RICHARDSON, 2016). A formação de biofilmes aumenta a tolerância microbiana às condições desfavoráveis no interior dos canais radiculares e ao tratamento endodôntico, o que é fundamental para o estabelecimento da infecção periapical (BURMØLLE et al., 2014). O tratamento endodôntico pode não ser efetivo na redução da população microbiana, podendo levar ao seu insucesso. Esse cenário de falha do tratamento é caracterizado pela persistência dos sinais e sintomas clínicos da infecção, sendo denominado Periodontite Periapical Persistente (DELBONI, et al., 2017; SIQUEIRA, et al., 2020).

A bactéria *Enterococcus faecalis* tem sido considerada como o principal patógeno da periodontite periapical persistente devido a sua alta frequência de isolamento de canais radiculares que já foram submetidos ao tratamento endodôntico (DELBONI et al., 2017; PRADA et al., 2019; SIQUEIRA et al., 2020). Por isso, a literatura demonstra que a maioria dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* que abordam a infecção endodônticas foram conduzidos fazendo uso de modelos de biofilmes monoespécie de *E. faecalis* (EICK, 2020; SWIMBERGHE et al., 2019). No entanto, pesquisas recentes têm expandido o número de espécies microbianas relacionadas com a patogênese das periodontites periapicais, incluindo bactérias, fungos e até mesmo vírus (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2022). Espécies eucarióticas, como o fungo *Candida albicans*, tem sido isolado de 5-20% casos e periodontite periapical persistente (DIAZ, 2021; MERGONI et al., 2018; PERSON; ÖZOK, 2017). O coisolamento de *E. faecalis* e *C. albicans* já foi reportado em infecções de mucosa e de canais radiculares (ABUSREWIL et al., 2020; DAHLÉN et al., 2012; KOVAC et al., 2013; PECIULIENE et al., 2001; POPTANI et al., 2013).

O tratamento endodôntico convencional visa a erradicação dos biofilmes, sendo realizado através da instrumentação mecânica e uso de irrigantes endodônticos no interior dos canais radiculares (ZEHNDER, 2006). Os irrigantes endodônticos mais comumente utilizados no tratamento endodôntico convencional são o hipoclorito de sódio (NaClO) e digluconato de clorexidina (CHX). NaClO apresenta uma efetiva atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e outros patógenos endodônticos, ainda que

esses se apresentem organizados em biofilmes, e também é capaz de dissolver componentes da matriz extracelular dos biofilmes e remanescentes de tecido pulpar necrótico (BOUSSIUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022; TARTARI et al., 2016). No entanto, NaClO apresenta alta citotoxicidade (GUIVARC'H et al., 2017) e também é capaz de prejudicar as propriedades mecânicas da dentina, comprometendo o tratamento restaurador (PASCON et al., 2009). CHX é a principal alternativa ao NaClO, sendo descrita como mais biocompatível e capaz de aderir a superfície da dentina e prolongar seu efeito antimicrobiano (GOMES et al., 2013). Porém, CHX foi menos efetivo do que NaClO contra comunidades sésseis, incluindo biofilmes de *E. faecalis* (FIALLOS et al., 2020). Diante disso, novas estratégias na terapia endodôntica, como o desenvolvimento de novos irrigantes, que podem agir sinergicamente com a clorexidina, devem ser investigados.

Fenotiazinas são um grupo de composto heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre, sendo classificados como agonistas de receptor de dopamina e clinicamente utilizados como agentes neurolépticos, anti-histamínicos ou agentes antieméticos. Recentemente, estudos tem descrito o potencial antimicrobiano das fenotiazinas prometazina (PMZ) e clorpromazina (CPZ) frente a células planctônicas e sésseis de patógenos bacterianos e fúngicos, assim como seu efeito sinérgico quando associado a outros antimicrobianos (AGUILAR-VEGA et al., 2021; BRILHANTE et al., 2020; CORDEIRO, et al., 2020; DONNERT et al., 2020; SOARES et al., 2019). Até a realização do presente estudo, nenhum trabalho anterior investigou o efeito de fenotiazinas contra micro-organismos planctônicos e biofilmes relacionados com infecções endodônticas, assim como também não foi investigado se a associação de irrigante endodôntico clorexidina com essas substâncias oferece sinergismo para sua ação antimicrobiana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecções endodônticas e Periodontites periapicais

Periodontites periapicais são doenças inflamatórias nos tecidos periapicais induzidas pela presença de biofilmes polimicrobianos no interior dos canais radiculares dentários, ocasionando reações inflamatórias que resultam na destruição do periodonto (TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2021). O início da doença endodôntica envolve a presença de agentes agressores à polpa dentária (Figura 1A, 1B). Uma lesão cáries que atinja a dentina da estrutura dentária pode transmitir estímulos a polpa através da movimentação de fluidos no interior de seus túbulos dentinários. Quando esse estímulo é menor, o processo inflamatório que se instala na polpa dentária é moderado, sendo caracterizado por sensibilidade dolorosa apenas quando provocada. Esse quadro clínico é denominado como pulpite reversível, onde a remoção do agente agressor, como a cárie dental, seguido dos tratamentos restauradores da estrutura dental, devolve a polpa a condição de saúde encontrada anteriormente (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2022).

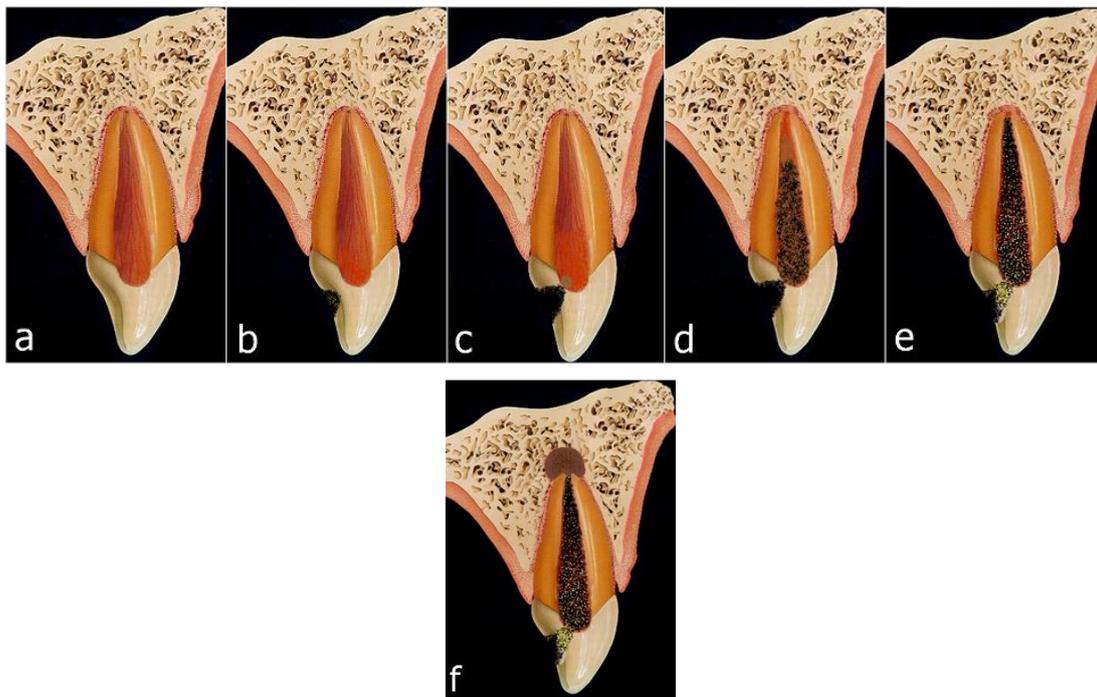
Porém, se o agente agressor não for removido e avançar pela extensão da dentina se encontrando mais próximo ou até na superfície da pulpar, a polpa dentária entra em um processo inflamatório intenso, com intermitente estímulo doloroso. Esse quadro clínico é denominado de pulpite irreversível, no qual a inflamação pulpar entra em um processo inflamatório tão severo que a saúde da normalidade pulpar já não pode mais ser recuperada (Figura 1C). A partir desse estágio clínico, a terapia endodôntica é o tratamento de escolha. Com a evolução do caso, a polpa entra em processo de necrose pulpar (QIAN et al., 2019; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2022; SIQUEIRA et al., 2016).

A partir desse estágio, os micro-organismos que se limitavam até a superfície da dentina e da polpa, conseguem invadir os canais radiculares, colonizando sua superfície com formação de biofilme (Figura. 1D, E). À medida que os micro-organismos colonizam toda a extensão do radicular, os tecidos de sustentação do periodonto (osso alveolar, ligamento periodontal e cemento) começam um processo de reabsorção óssea alveolar, na tentativa de confinar a infecção presente no dente, para que essa não invada outros níveis teciduais (Figura 1F). Essa reabsorção é facilmente visualizada em radiografias dentais, sendo denominadas como lesões periapicais. Uma

vez que o estímulo infeccioso é removido, essas lesões periapicais regridem, sinalizando o sucesso do tratamento endodôntico (BOUILLAGUET et al., 2018; DIOGUARDI et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2016; WONG, et al., 2021).

Dependendo da evolução clínica as infecções endodônticas podem ser classificadas em primárias, secundárias ou persistentes. Se o dente infectado não tiver sido submetido a tratamento endodôntico prévio, contemplado com a instrumentação mecânica, irrigação e obturação radicular, a infecção é denominada como infecção endodôntica primária. A infecção endodôntica primária é caracterizada pela presença de biofilme polimicrobiano, composto principalmente por aeróbios e anaeróbios facultativos, entre eles, *Bacteroides* sp., *Prophyromonas* sp., *Prevotella* sp., *Fusobacterium* sp., *Treponema* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Eubacterium* sp. e *Campylobacter* sp. (WONG et al., 2021).

Devido às complexidades anatômicas radiculares e às bactérias resistentes ao tratamento, a completa desinfecção dos canais ainda não é uma realidade clínica, podendo levar ao insucesso do tratamento (SIQUEIRA et al., 2014). Uma vez que o tratamento endodôntico tenha falhado na desinfecção dos canais radiculares, com persistência dos sinais clínicos de infecção radicular, o quadro clínico é denominado periodontite periapical persistente. O microbioma da periodontite periapical persistente difere da primária, uma vez que após o dente ser submetido ao tratamento endodôntico, o microambiente de seu canal radicular passa por uma intensa transformação. Os micro-organismos presentes nesse estágio da infecção são caracterizados por resistir a condições de baixa disponibilidade nutricional e variações de pH. Geralmente, as infecções endodônticas persistentes possuem uma menor diversidade microbiana do que as infecções endodônticas primárias tendo como gêneros predominantes *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus* sp., *Lactobacilli* sp. e *Actinomyces* sp. (NEELAKANTAN et al., 2017).



**Figura 1.** Evolução clínica das infecções endodônticas. (a) Unidade dentária íntegra, com vitalidade pulpar; (b,c) Cárie dental com transmissão dos irritantes microbianos para polpa dentária, induzindo pulpite reversível que pode evoluir para pulpite irreversível. (d) Necrose pulpar inicial que possibilita a invasão parcial dos microorganismos no sistema dos canais radiculares, sendo restrita às regiões de polpa não-vital. (e) Necrose pulpar total, que possibilita a invasão completa do sistema radiculares. (f) Periodontite periapical: reação inflamatória dos tecidos periodontais à infecção dos canais radiculares, podendo ser detectada radiograficamente pela formação da reabsorção periapical. (Fonte: endodontiaavancada.com)

## 2.2 *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos amplamente descritos tanto como membros da microbiota normal do trato gastrointestinal humano como patógenos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; GOH et al., 2017; KRAWCZYK et al., 2021; SIEVERT et al., 2013). São pertencentes ao domínio Prokaryota, reino Bacteria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Enterobacteriaceae, gênero *Enterococcus*. A origem do seu nome significa intestino, relativo a “enteron”, grão, relativo *coccus* e *faecalis*, relativo a fezes. Inicialmente, foram classificados como *Streptococcus* do grupo D, pois possuem um antígeno da parede celular do grupo D, um ácido teicóico glicerol associado a membrana

plasmática. Em 1984, os enterococos foram classificados em um novo gênero, *Enterococcus*, com um total de 38 espécies, tendo *E. faecalis* e *E. faecium* como as de maior relevância na clínica médica.

A análise microscópica revela cocos Gram-positivos dispostos em cadeias curtas ou em diplococos (Figura 2A). Crescem tanto em condições de aerobiose como anaerobiose (anaeróbios facultativos), em uma ampla faixa de temperatura (10 °C a 45 °C). Possuem exigências nutricionais complexas, mas crescem em meios enriquecidos como ágar sangue de carneiro e meio Infusão cérebro coração (BHI). Com 24 h de incubação, as colônias de *E. faecalis* se apresentam-se geralmente como não-hemolíticas, sendo raro a presença de  $\alpha$ -hemólise ou  $\beta$ -hemólise (Figura 2B). Em relação a testes bioquímicos são catalase negativos (Figura 2C), bile-esculina positivos (Fig. 2D) e *L-Pyrrolidonyl-Beta-Naphytlamide* (PYR) positivos (Figura 2E). Para diferenciar *Enterococcus* sp. de outros cocos Gram-positivos em cadeia, essas espécies são capazes de crescerem em concentrações elevadas de NaCl (6,5%) e sais biliares (Figura 2F). Características fenotípicas, outros testes bioquímicos e sequenciamento de ácidos nucléicos são necessários para a diferenciação de *E. faecalis* e outras espécies de seu gênero (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

*Enterococcus* sp. são uma espécie ubíqua, podendo estar presente no solo, água, em associação com plantas e trato gastrointestinal de vertebrados e invertebrados. Na microbiota humana, *E. faecalis* é geralmente isolado em altas concentrações no intestino grosso e no trato geniturinário, sendo o primeiro o mais prevalente. O isolamento de *E. faecalis* em sítios como pele e trato respiratório é mais frequente em pacientes hospitalizados fazendo uso de antibioticoterapia de amplo espectro. A maioria das infecções por *E. faecalis* são decorrentes da microbiota do paciente, algumas sendo decorrentes da disseminação de uma cepa para outro hospedeiro. Pacientes hospitalizados e sob prolongada terapia antimicrobiana de amplo espectro são mais susceptíveis a infecções por *Enterococcus* sp. (KRAWCZYK et al., 2021).

Sua distribuição heterogênea está relacionada a sua considerável adaptabilidade, sendo capaz de sobreviver em ambientes de baixa disponibilidade nutricional, diferentes níveis de pH, de temperatura e osmolaridade (GACA; LEMOS, 2019; LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014). Além disso, *E. faecalis* apresenta resistência intrínseca à vários antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, aminoglicosídeos, clindamicinas, sulfametoxazol com trimetoprima e irrigantes de

tratamento endodôntico (ARDIZZONI et al., 2018). Essa multirresistência antimicrobiana pode ser atribuída a significativa plasticidade genômica do gênero *Enterococcus*, possibilitando a aquisição de resistência tanto por mutações quanto por transferência horizontal de material genético (DAHLÉN et al., 2012; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019), além de um diverso arsenal de fatores de virulência. Entre seus mecanismos de virulência, a literatura tem descrito que *E. faecalis* apresenta proteína ligante ao colágeno, proteínas de superfície (ARORA; GORDON; HOOK, 2021), substância de agregação (VAN SCHAIK et al., 2010), *pili* (TELFORD et al., 2006), citolisinas (HAAS; SHEPARD; GILMORE, 2002), gelatinases, (THURLOW et al., 2010), hialuronidasas (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004), liberação de peróxidos extra-celulares (GACA; LEMOS, 2019), produção de exopolissacarídeos (RAMOS; MORALES, 2019), produção de cápsula de polissacarídeos, bacteriocinas e capacidade de formar biofilme (KRAWCZYK et al., 2021). Genes que codificam esses fatores de virulência de *E. faecalis* são geralmente localizados em ilhas de patogenicidade ou em elementos genéticos móveis (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

*Enterococcus* sp. são patógenos oportunistas que, uma vez fora de seu *habitat* comensal (trato gastrointestinal), podem ser a causa de várias infecções, como infecções do trato urinário, sepse, endocardite e periodontites periapicais persistentes (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020; SAKKO; TJÄDERHANE; RAUTEMAA-RICHARDSON, 2016). Hospitais são considerados reservatórios de cepas de *Enterococcus* sp. com multirresistência a antibióticos. Trabalhadores da saúde são considerados vetores dessas cepas multirresistentes, podendo induzir infecção cruzada entre pacientes de um mesmo hospital. Entre as espécies mais comumente isoladas de infecções hospitalares estão *E. faecalis* (80-90%) e *E. faecium* (5-15%) (KRAWCZYK et al., 2021). Não são incomuns o coisolamento de *E. faecalis* com outras espécies microbianas, caracterizando infecções polimicrobianas (HERMANN et al., 1999).

No contexto de periodontites periapicais persistentes, *E. faecalis* apresenta características fundamentais para sobrevivência no árido ambiente de canais radiculares previamente tratados, além da capacidade de formar biofilmes e induzir resposta imune do hospedeiro (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020). Mesmo após instrumentação mecânica e irrigação endodôntica, a completa erradicação de *E. faecalis* dos canais radiculares nem sempre é alcançada (EDDY et al., 2005; VIANNA, et al., 2004). A capacidade de sobrevivência de biofilmes de *E. faecalis* à baixa

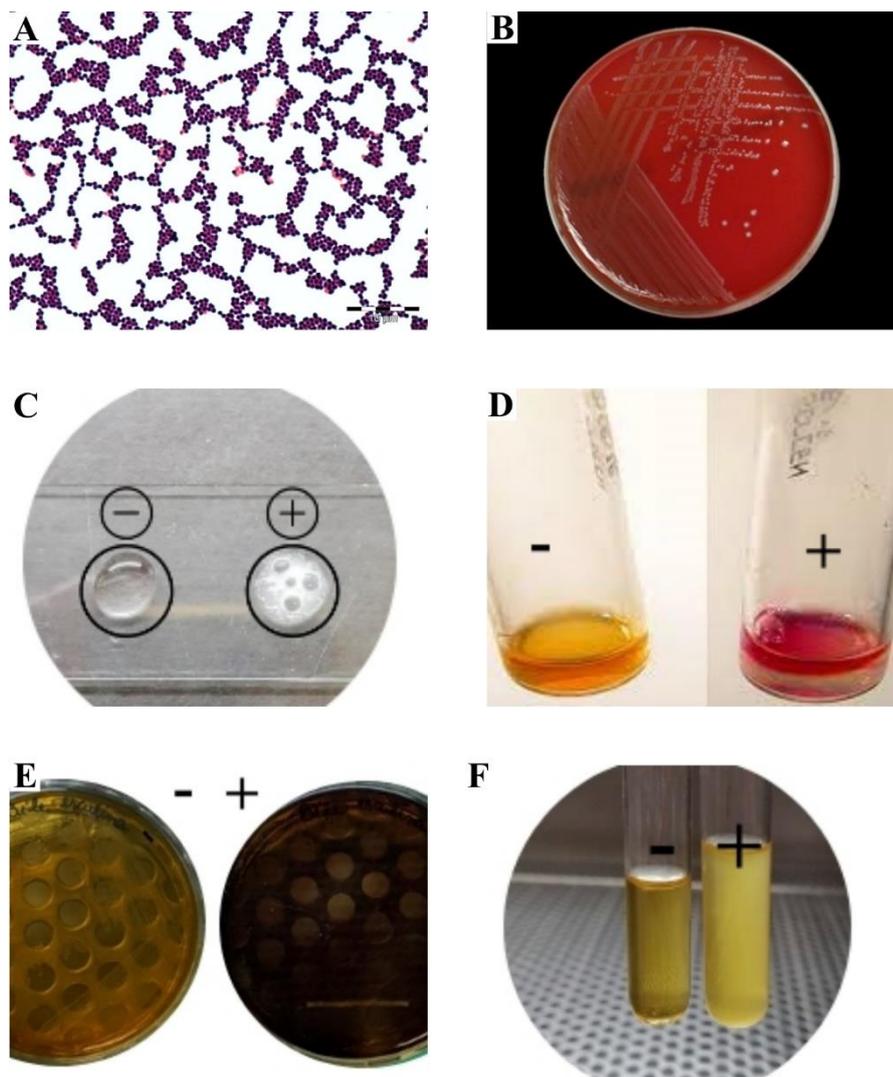
disponibilidade nutricional e alcalinidade dos canais radiculares já foi descrita anteriormente, sendo capaz de permanecer viável em condições extremas (RICHARDS; DAVIES; FIGDOR, 2010). Além disso, análises de expressão gênica avaliaram que *E. faecalis* não perde sua expressão de genes virulência nessas condições, garantindo sua capacidade de continuar induzindo a patogênese das periodontites periapicais (GAO et al., 2016; GUTIÉRREZ et al., 2022). Na forma de biofilme, *E. faecalis* é capaz de modular o sistema imune e sintetizar a macromoléculas de virulência que induzem dano aos tecidos periapicais (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020).

A prevalência de *E. faecalis* nos casos de insucesso endodôntico vem sido discutido na literatura, variado de 89,6 % a 11,6 % (ENDO et al., 2013; PEREIRA et al., 2017; SEDGLEY et al., 2006; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2004). Essa discordância entre autores se deve principalmente a grande diversidade de técnicas de isolamento e identificação laboratorial dos micro-organismos. No entanto, outras espécies têm sobressaído sua importância nos casos de insucesso endodôntico, como *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Solobacterium moorei* (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020; SCHIRRMESTER et al., 2009). No entanto, a maioria dos estudos envolvendo biofilmes endodônticos ainda utiliza modelos de biofilme com *E. faecalis* monoespécie ou em associação com outras espécies de micro-organismos (SWIMBERGHE et al., 2019).

Os mecanismos de resistência de *E. faecalis* contra o tratamento endodôntico têm sido investigados na literatura. *E. faecalis* é capaz de sobreviver na presença de medicação intracanal como hidróxido de cálcio e outros irrigantes, o que possibilita driblar as medidas de desinfecção do tratamento endodôntico. *E. faecalis* também é capaz de utilizar o fluido do ligamento periodontal como fonte nutricional e formar biofilmes como proteção contra agentes antimicrobianos e sistema imune do hospedeiro (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020). Além disso, *E. faecalis* pode desenvolver resistência contra antibióticos comumente utilizados na prática odontológica clínica, como azitromicina, e são capazes de penetrar nos túbulos dentinários e se ligar ao colágeno dos canais radiculares (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019)

O tratamento contra infecções de *Enterococcus* sp. tradicionalmente tem como base a associação entre um aminoglicosídeo e outros agentes antimicrobianos com ação na parede celular. No entanto, o crescimento de cepas resistentes a vancomicina (*Vancomycin Resistant Enterococcus*-VRE), vem se tornando cada vez

mais frequentes na prática clínica, sendo um desafio para a terapêutica antimicrobiana. Esse aumento de resistência é mediado pela troca de plasmídeos entre essas bactérias e até mesmo pela interação com outras espécies de micro-organismos. O desenvolvimento de novos antimicrobianos e de novas estratégias contra o crescimento e infecção de *E. faecalis* vem sendo frequentemente abordados na literatura (BOUSIOUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022).



**Figura 2.** Identificação laboratorial de *Enterococcus* sp. (A) Cocos Gram-positivos dispostos em cadeias curtas ou em diplococos; (B) Colônias não-hemolíticas em ágar-sangue. (C) Catalase negativos (-); (D) PYR positivas; (E) Bile-esculina positivos (+); (F) Crescimento positivo em NaCl 6.5 % (+). Fonte: Wellinghausen et al. (2009); Instituto de patologia tropical e bacteriologia humana da Universidade Federal de Goiás.

### 2.3 *Candida albicans*

*C. albicans* é a espécie fúngica do gênero *Candida* mais frequentemente associada com infecções oportunistas em humanos. O gênero *Candida* pertence ao domínio Eukaryota, reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetacea. A visualização microscópica de *C. albicans* inclui brotamentos ou gemulações, bem como estruturas tubulares como hifas ou pseudo-hifas. A identificação laboratorial de *C. albicans* pode ser realizada através do teste do tubo germinativo, o qual se apresenta como tubo germinativo positivas (Figura 3A); prova do microcultivo, onde pode-se visualizar clamidoconídeos e blastoconídeos em cacho (Figura 3B), teste de assimilação de carboidratos (Figura 3C), prova da urease, onde pode constatar-se hidrólise de uréia (Figura 3D); teste de assimilação de nitrogênio; ensaios moleculares e automatizados. São frequentemente isolados tanto da microbiota humana normal como patógenos, sendo o principal agente associado a infecções fúngicas em humanos (SELLAM; WHITEWAY, 2016). Tem sido frequentemente relatados casos de *C. albicans* resistentes a antifúngicos (FOX et al., 2014). São extremamente adaptados para a colonização do corpo humano, e seus fatores de virulência incluem produção de adesinas (NAGLIK et al., 2017), formação de hifas (SELLAM; WHITEWAY, 2016), produção de enzimas hidrolíticas (YOO et al., 2020) e formação de biofilme (CHANDRA et al., 2001; GULATI; NOBILE, 2016; RAMAGE et al., 2012).

Uma vez que o hospedeiro apresenta imunossupressão, *C. albicans* pertencentes à microbiota podem se tornam patogênicas, ocasionando de infecções na pele e submucosa a infecções profundas invasivas. As espécies do gênero *Candida* são classificadas como patógenos oportunistas, sendo geralmente relacionadas com imunossupressão, uso de dispositivos médicos e infecções nosocomiais (FOX et al., 2014). Suas manifestações clínicas incluem candidíases superficiais (cutâneo-mucosas), com manifestações cutâneas, oro-faríngeas e genitais, e candidíases profundas (sistêmicas) (WITHERDEN et al., 2017). As candidíases orais induzem desconforto, dor, alteração do paladar, disfagia e se disseminadas para a faringe podem provocar dor ao engolir. Em pacientes imunossuprimidos, podem se disseminar por via hematogênica ou pelo trato gastrointestinal superior, resultando em infecção grave com aumento da taxa de morbidade e mortalidade (FRASER et al., 1992; MORALES; HOGAN, 2010). Entre as candidíases orais, as manifestações clínicas mais comuns

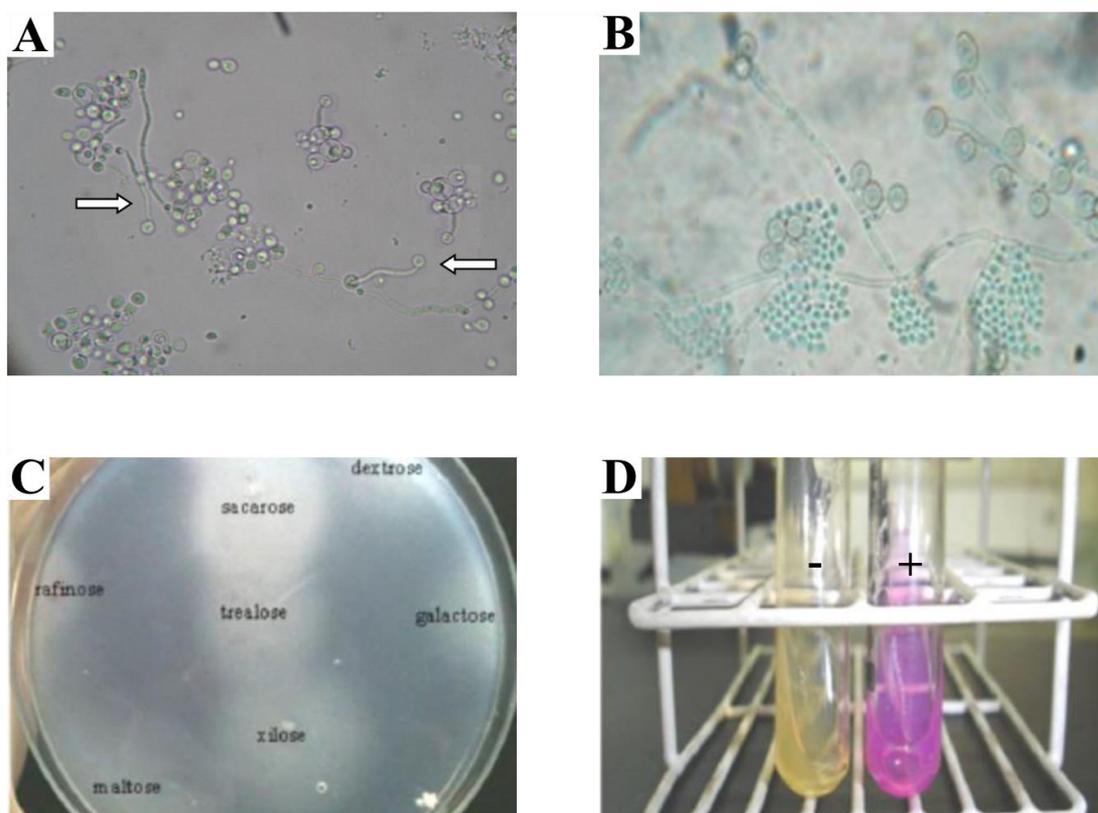
incluem: candidíases pseudomembranosas, candidíases atróficas agudas, queilite angular, candidíase hiperplásica crônica e queilite candidósica (SELLAM; WHITEWAY, 2016).

*C. albicans* é a espécie fúngica mais frequentemente detectada na cavidade oral, porém outras espécies do gênero também podem ser isoladas, como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. A distribuição de espécies do gênero na cavidade oral é diversa, sendo o sítio mais comum no dorso da língua. Isolados de *C. albicans* já foram detectados em bolsas periodontais, canais radiculares e cáries (KOO; ANDES; KRYSAN, 2018). Em indivíduos saudáveis, o controle da colonização de *C. albicans* na cavidade oral ocorre por remoção mecânica pela saliva e descamação natural das células epiteliais da mucosa. Além disso, bactérias orais comensais inibem o desenvolvimento dos biofilmes por *C. albicans* (WILLIAMS; LEWIS, 2011). Porém, em condição de disbiose do microbioma oral, estudos têm sugerido que o fungo em questão desempenha um papel subsidiário, agindo em sinergismo com as bactérias patogênicas clássicas (PEREIRA, et al., 2018).

Existem fatores locais, sistêmicos e medicamentosos que predispõe a colonização fúngica da cavidade oral. Os fatores locais são inerentes a características fisiológicas orais e hábitos do hospedeiro, como hipossalivação, pobre higiene oral, higienização deficiente das próteses orais, cáries dentais, tabagismo e microtraumas. Já os fatores sistêmicos são relacionados a condições da saúde geral do indivíduo, que incluem radioterapia de cabeça e pescoço, malignidades, vírus HIV, diabetes, anemia e deficiência de ferro, síndrome de Down, má-nutrição, neutropenia e transplantes. O uso de medicamentos também influi diretamente na colonização oral de *C. albicans*, como nos casos de antibioticoterapia prolongada, uso de corticoides, quimioterapia e uso de outras drogas imunossupressoras (PATEL, 2022). O mutualismo entre *C. albicans* na formação de biofilme na presença de bactérias orais foi observado em modelos *in vitro* e murino (BERTOLINI; DONGARI-BAGTZOGLU, 2019; XU et al., 2014).

No contexto de periodontites periapicais, fungos são isolados de cerca de 3 a 18% dos canais radiculares, (MERGONI et al., 2018; SIQUEIRA; SEN, 2004), com a predominância da espécie *C. albicans* que varia de 0,5% a 55 %. Essas leveduras são capazes de aderir tanto à superfícies abióticas, como o material obturador, quanto à superfícies bióticas, como estrutura dental e periodonto. São dentinofílicas,

colonizando a dentina da cavidade oral e formando biofilmes compostos de blastoconídeos, hifas e pseudo-hifas embebidas em matriz extracelular, o que garante a formação de biofilmes sólidos e estruturalmente resistentes (GULATI; NOBILE, 2016). A complexa parede celular de *C. albicans* apresenta adesinas, fatores de agregação, manana, quitina, glucanos, DNA, RNA e moléculas de *quorum sensing* que são fundamentais para invasão tecidual e modulação do sistema imune envolvidas com a patogênese das periodontites periapicais (YOO et al., 2020) Frequentemente são isoladas em associação com *E. faecalis* em periodontites periapicais persistentes (POPTANI et al., 2013; SAKKO; TJÄDERHANE; RAUTEMAA-RICHARDSON, 2016). Assim como *E. faecalis*, *C. albicans* pode colonizar o trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, pode apresentar resistência a ampla faixa de antimicrobianos, apresenta associação com infecções nosocomiais, capacidade de formar biofilme e demonstra capacidade de resistência a condições ambientais adversas (RICHARDS; DAVIES; FIGDOR, 2010).



**Figura 3.** Identificação laboratorial de *Candida albicans* (A) Prova do tubo germinativo positiva; (B) Prova do microcultivo, onde pode-se visualizar clamidoconídeos e blastoconídeos; (C) Ensaio de assimilação de carboidratos (-); (D)

Ensaio de Urease positiva. Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2010); Centro especializado em Micologia Médica-UFC (2012).

#### **2.4 Interações entre *E. faecalis* e *C. albicans***

A literatura vêm investigando a natureza das interações entre fungos e bactérias, que têm sido descritas como uma relação de mutualismo, competição ou indiferença (ELISE et al., 2016). A microbiota apresenta uma complexa diversidade de interações microbianas, envolvendo bactérias, fungos e vírus ocupando nichos específicos no corpo humano (MARSLAND; GOLLWITZER, 2014; NASH et al., 2017; WITHERDEN et al., 2017). Existem evidências da existência de biofilmes *interkingdom* tanto na microbiota do hospedeiro saudável, como na indução de doença infecciosa com descrição de suas implicações clínicas (MORALES; HOGAN, 2010). A interação entre micro-organismos envolve a comunicação por micromoléculas e proteínas, comunicação por *quorum sensing*, produção de metabólitos secundários, liberação de sinalizadores intracelulares, mudanças ambientais e formação de biofilmes multiespécie (KRÜGER et al., 2019). Através dessas interações, bactérias e fungos podem mutualmente favorecer seu crescimento, ou podem competir entre si, levando à supressão de uma espécie micro-organismo em detrimento do crescimento da outra (NOGUEIRA et al., 2019).

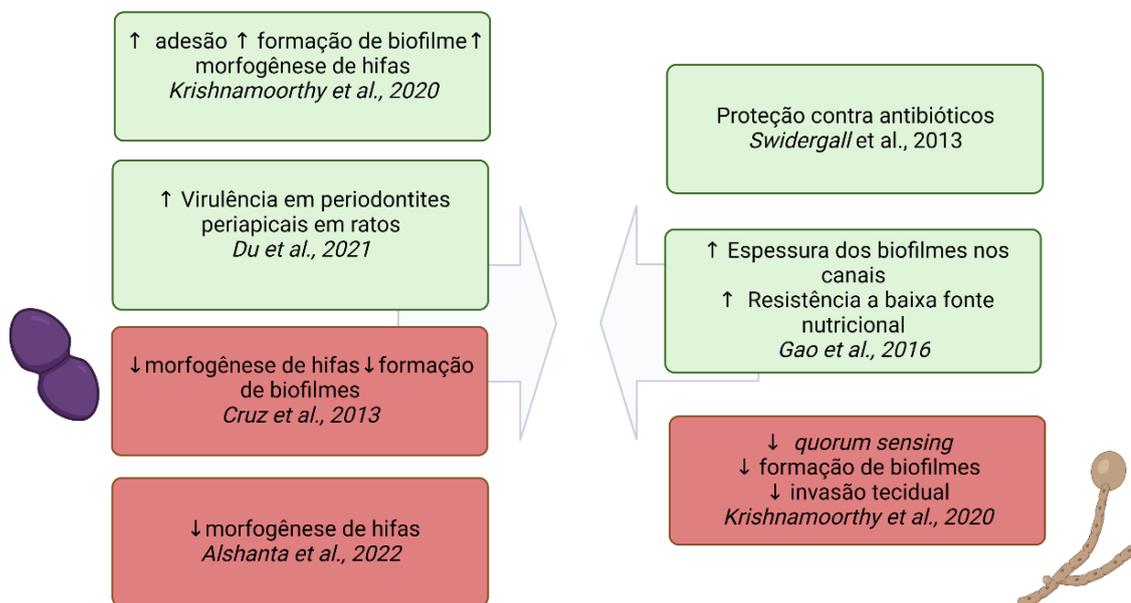
Como descrito anteriormente, *E. faecalis* e *C. albicans* são membros da microbiota humana, ao mesmo tempo que podem ser patógenos oportunistas (FOX et al., 2014; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; MERSEGUEL et al., 2015; SIEVERT et al., 2013). Essas duas espécies de micro-organismos são frequentemente isoladas como comensais nos mesmos nichos do corpo humano, como trato gastrointestinal (GRAHAM et al., 2017), amostras clínicas de pacientes hospitalizados (HERMANN et al., 1999; KLOTZ et al., 2007), ou no interior do canal radicular de dentes com periodontite periapical persistente (KOVAC et al., 2013; SAKKO; TJÄDERHANE; RAUTEMAA-RICHARDSON, 2016). A frequência com que as duas espécies são isoladas em conjunto pode significar uma semelhança em seu ciclo biológico e/ou uma interação que venha a ter significância clínica (GARSIN; LORENZ, 2013). Ambos são aptos a produzir biofilmes orais, o que aumenta sua capacidade de resistir ao tratamento antimicrobiano, à remoção mecânica e ao sistema imune do hospedeiro (GAO et al., 2016).

Hermann *et al.* (1999) em um estudo clínico em UTIs, detectaram coinfeção de *E. faecalis* e fungos em 22 % dos pacientes, abrangendo uma grande variedade de amostras clínicas. Juntamente com *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis* é a bactéria mais coisolada de pacientes com candidemia (KLOTZ *et al.*, 2007). Cruz *et al.* (2013) utilizaram modelo animal invertebrado *Caenorhabditis elegans* para avaliar a variação de virulência de *C. albicans* e *E. faecalis* em mono infecção ou em coinfeção. Os autores observaram redução na morfogênese de hifas de *C. albicans* quando em coinfeção com *E. faecalis*, acompanhada de significativa redução na taxa de mortalidade do animal, sugerindo uma redução de virulência fúngica. Esses resultados foram atribuídos a liberação de compostos via sistema *quorum sensing* de *E. faecalis*, sendo posteriormente identificados como bacteriocina EntV (GRAHAM *et al.*, 2017). Uma proteína não-hemolítica produzida por *E. faecalis* foi caracterizada e foi constatada que a mesma é capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* (ACP), inclusive de cepas multirresistentes (SHEKH; ROY, 2012).

Swidergall e Ernst (2013) descreveram uma proteína da membrana de *C. albicans* capaz de se ligar a proteínas de antibióticos e a peptídeos do sistema imune, o que pode conferir proteção a *E. faecalis* em infecções a longo prazo. Gao *et al.* (2013) demonstraram que *E. faecalis* é mais resistente a restrição nutricional in coexistência com *C. albicans*, formando biofilmes mais densos e espessos em canais radiculares na presença da levedura.

Estudos mais recentes avaliaram a expressão gênica dos dois micro-organismos em coinfeção. Dutton *et al.* (2016) verificaram que a adesão de *C. albicans* a *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp., é mediada por uma proteinase associada a parede celular, aspartil-proteinase (Sap9), possuindo papel fundamental no desenvolvimento do biofilme. Utilizando modelo de mucosa oral organotípica, Krishnamoorth *et al.* (2020) demonstraram que genes de *C. albicans* relacionados com a virulência (adesão, morfogênese de hifas, formação de biofilme) tiveram sua expressão aumentada na presença de *E. faecalis*, enquanto genes bacterianos envolvidos com *quorum sensing*, formação de biofilme e invasão celular tiveram sua expressão reduzida. Comparando mono infecções e coinfeções em periodontites periapicais provocadas em ratos, Du *et al.* (2021) concluíram que *E. faecalis* em coexistência com *C. albicans* induziram uma maior produção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , pelo hospedeiro. Mais recentemente, a partir de análise de expressão gênica, Alshanta *et al.* (2022) demonstraram que *E. faecalis*

induziu redução de expressão de genes fúngicos relacionados com morfogênese de hifas e formação de biofilme, através de seu impacto nos níveis de pH, biossíntese de aminoácidos e rotas metabólicas das leveduras (Figura 4).



**Figura 4:** Efeitos da interação de *E. faecalis* e *C. albicans* previamente descritos na literatura.

## 2.5 Irrigantes endodônticos

Os irrigantes endodônticos mais comumente utilizados na prática endodôntica são o hipoclorito de sódio (NaClO) e o digluconato de clorexidina (CHX). O principal irrigante químico utilizado na prática endodôntica é o hipoclorito de sódio (NaClO), que é um desinfetante classificado como composto halogenado que vem sendo utilizado em concentrações que variam de 0,5 % a 5,25 % (KANDASWAMY; VENKATESHBABU, 2010). No estado de solução aquosa, NaClO origina hidróxido de sódio e ácido hipocloroso, que pela liberação de cloro ativo é responsável pela ação desinfetante do composto. O NaClO possui efeito antibacteriano e antifúngico efetivo contra patógenos endodônticos, ainda que organizados em biofilmes, além de apresentarem capacidade de dissolver componentes da matriz exopolimérica de biofilmes e remanescentes de tecido necrótico (GHIVARI et al., 2017). No entanto, NaClO apresenta alta toxicidade celular, causando danos aos tecidos periapicais por

meio da oxidação, podendo retardar o processo de reparação (BOUTSIUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022). Além disso, o NaClO possui outras desvantagens como a incompleta erradicação bacteriana dos canais, alto potencial alergênico, odor desagradável, potencial corrosivo e alterações nas propriedades mecânicas da dentina (GU et al., 2017; HAAPASALO et al., 2014; HARALUR et al., 2022). A ação de irrigantes como NaClO na superfície da dentina pode alterar sua composição química e estrutural. Essas alterações incluem diminuição da resistência dentinária ao estresse, diminuição da adesão de materiais obturadores às paredes do canal (BOUTSIUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022; PASCON et al., 2009).

Diante das desvantagens do NaClO, o digluconato de clorexidina (CHX) é atualmente a principal alternativa ao NaClO como irrigante por apresentar baixa toxicidade, boa ação antimicrobiana, substantividade e não interferir na matriz orgânica colágena da dentina (GOMES, et al., 2013). CHX é uma bisbiguanida catiônica, com efeito antimicrobiano de amplo espectro que tem sido utilizada como irrigante final após o tratamento endodôntico ou como veículo de medicação intracanal (ZEHNDER, 2006). Os cátions de CHX interagem com os fosfolípidios da membrana microbiana, induzindo permeabilização celular. Além disso, exercem efeito na parede celular microbiana e induzem coagulação de nucleoproteínas (KRITHIKADATTA; INDIRA; DOROTHYKALYANI, 2007).

Estudos anteriores concluíram que CHX apresenta ação antimicrobiana igual ou superior a NaClO (SENA et al., 2006; VIANNA et al., 2004), porém esses estudos se limitaram a uma avaliação apenas utilizando *E. faecalis* como espécie teste (SWIMBERGHE et al., 2019). Estudos mais recentes utilizando modelos biofilmes multiespécie revelaram que CHX apresenta atividade antimicrobiana significativamente inferior a NaClO e incapacidade de dissolver a matriz exopolimérica (BUSANELLO et al., 2019; RUIZ-LINARES et al., 2017). No entanto, a CHX não possui capacidade de dissolução tecidual, o que preclui seu uso como irrigante primário (OKINO et al., 2004; TARTARI et al., 2016). A associação de NaClO e CHX já foi sugerida a fim de compensar as limitações de cada irrigante, potencializando suas propriedades. Embora essa associação seja vantajosa no aspecto antimicrobiano (VIANNA; GOMES, 2009), sob ponto de vista químico, o resíduo das duas substâncias forma um precipitado marrom e seus subprodutos podem ser prejudiciais ao tratamento endodôntico (FERREIRA et al., 2008). Esse precipitado possui como principais efeitos deletérios: obliteração dos túbulos dentinários, formação de *smear*

*layer*, citotoxicidade e manchamento da estrutura dentinária.

Diante das limitações dos irrigantes convencionais NaClO e CHX aqui descritos, a literatura vem investigando a aplicação de novas estratégias para o tratamento químico endodôntico, como o desenvolvimento e aplicação de novos irrigantes endodônticos (BOUTSIUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022). Fenotiazinas são um grupo de compostos orgânicos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre, sendo relacionados com compostos de tiazinas e classificados como agonistas de receptores de dopamina. A síntese da fenotiazina primária ocorre pela reação de difenil amina com enxofre, cujo produto é usado para a fabricação de diversos derivados (PADNYA; KHADIEVA; STOIKOV, 2022). Esse grupo apresenta vários efeitos biológicos, como efeito anti-histamínico, neuroléptico, antitumoral, antipasmódico, anti-helminto, antibacteriano, antiviral e atividade antioxidante. A fenotiazina Prometazina (PMZ) é sintetizada pela alquilação da fenotiazina primária com cloreto de 1-dimetilamino-2-propilo. A reação de 3-cloro-n-fenilbenzammina com o enxofre da fenotiazina primária gera 2-cloro-10H-fenotiazina, cuja alquilação resulta na síntese de Clorpromazina (CPZ) (PADNYA; KHADIEVA; STOIKOV, 2022).

Na prática clínica, as fenotiazinas são comumente utilizadas para o tratamento da esquizofrenia, náusea, metemoglobinemia, distúrbio de ansiedade e porfiria (POSSO et al., 2022). Recentemente, muitos estudos descreveram a potencial atividade antimicrobiana dos derivados das fenotiazinas Prometazina e clorpromazina contra células planctônicas e sésseis de ambos patógenos bacterianos e fúngicos. (AGUILAR-VEGA et al., 2021; BRILHANTE et al., 2020; CORDEIRO et al., 2020; DONNERT et al., 2020; SOARES et al., 2019). Rahbar et al. (2010) encontraram atividade antimicrobiana de prometazina e clorpromazina contra crescimento planctônico de *Enterococcus* sp. Além disso, Galgóczy et al. (2011) e Ells et al. (2013) descreveram a atividade antimicrobiana de fenotiazinas contra células planctônicas e biofilmes de *C.albicans*.

### 3 HIPÓTESES

- A formação de biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* é dependente de condições físico-químicas experimentais.
- Os biofilmes duo-espécie possuem características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e sensibilidade a antimicrobianos distintas dos biofilmes monoespécie de ambos os micro-organismos estudados.
- As fenotiazinas prometazina e clorpromazina possuem propriedades antimicrobianas comparáveis com os irrigantes endodônticos convencionais hipoclorito de sódio e clorexidina.
- As fenotiazinas prometazina e clorpromazina induzem aumento da capacidade antimicrobiana da clorexidina.
- *C. albicans* altera significativamente a expressão de genes de *E. faecalis*.
- O efeito de *C. albicans* na virulência de *E. faecalis* pode ser detectado em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivos otimizar e caracterizar biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, avaliar efeito antimicrobiano das fenotiazinas prometazina e clorpromazina contra esses biofilmes e investigar as repercussões que essa interação *interkingdom* exerce sobre a expressão gênica de *E. faecalis*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições físico-químicas para o desenvolvimento *in vitro* de biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*.
- Caracterizar os biofilmes duo-espécie quanto a aspectos morfológicos ultraestruturais e composição bioquímica de carboidratos e proteínas.
- Investigar o impacto que anfotericina B e vancomicina exercem sobre a biomassa, unidades formadoras de colônia de *E. faecalis* e *C. albicans*, morfologia ultraestrutural e composição bioquímica dos biofilmes duo-espécie.
- Investigar a sensibilidade de biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* a irrigantes endodônticos convencionais Hipoclorito de sódio e Digluconato de clorexidina e às fenotiazinas Prometazina e Clorpromazina.
- Investigar o efeito da interação farmacológica entre Clorexidina e as fenotiazinas Prometazina e Clorpromazina sobre seu efeito antimicrobiano.
- Investigar por meio de sequenciamento de RNA o efeito de *C. albicans* na expressão gênica de *E. faecalis* quando em biofilme duo-espécie.
- Com base nos resultados do sequenciamento de RNA, investigar o impacto que *C. albicans* pode exercer sobre a virulência de *E. faecalis* através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local de estudo

A primeira e a segunda partes do presente estudo foram realizadas no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e no Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes (LAPERRE), pertencentes ao Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas na Central Analítica da UFC, enquanto as análises de composição bioquímica foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC. A terceira do estudo foi realizada no *Lemos-Abranches Lab*, pertencentes ao *Oral Biology Department* do *College of Dentistry* da *University of Florida* (UF).

### 5.2 Organograma experimental

Este trabalho foi organizado em três etapas distintas. A primeira parte foi voltada para o estabelecimento e caracterização dos biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* (Fig. 5). De acordo com esse modelo estabelecido, a segunda parte objetivou avaliar a sensibilidade desses biofilmes a irrigantes endodônticos e às fenotiazinas (Fig. 6). Por fim, a terceira parte realizou uma análise de sequenciamento de RNA (RNA-seq) de *E. faecalis* nos biofilmes monoespécie e duo-espécie, e de acordo com os resultados encontrados, confirmação experimental *in vitro* e *in vivo* dos principais genes com expressão gênica aumentada (Fig. 7).

### 5.3 Cepas e cultivo

Para a primeira e segunda parte do estudo, *E. faecalis* ATCC 29212 e *C. albicans* ATCC 10231 foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC). Os micro-organismos foram estocados a -20 °C em 5 % de glicerol. Depois de descongeladas, as células microbianas foram transferidas para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, KASVI, Brasil) e mantidas por 18 h a 37 °C, em aerobiose. Em seguida, uma alçada das culturas foi transferida para ágar *Mitis salivarius* (Sigma-Aldrich,

EUA) ou ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol (Kasvi, Brasil) para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. As placas foram então incubadas por 18 h a 37 °C, em aerobiose.

Para a terceira parte do estudo *E. faecalis* OG1RF (ATCC 47077) e *C. albicans* SC5134 foram obtidas do ATCC. Os micro-organismos foram estocados a -20 °C em 30 % glicerol. As células microbianas depois de descongeladas foram transferidas para caldo BHI (Becton Dickson, EUA) e incubadas por 18 h a 37 °C, em atmosfera aeróbica. Em seguida, uma alçada das culturas foi transferida para ágar Mitis salivarius (Becton Dickson, EUA) ou ágar Sabouraud com cloranfenicol (Becton Dickson, Nova Jérsei, EUA) para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. As placas foram então incubadas por 18 h a 37 °C, em aerobiose.

#### 5.4 Preparo das cepas mutantes de *E. faecalis* OG1RF

As cepas mutantes por inserção de *transposon* no locus OG1RF 10019 (OG1RF Tn::10019), OG1RF 10020 (OG1RF Tn::10020) e OG1RF\_10021 (OG1RF Tn::10021) foram cedidas pelo *Dunnys lab* (*University of Alabama*, EUA) estocadas a -80 °C em 30 % glicerol. Depois de descongeladas, as células microbianas foram transferidas para BHI ágar (Becton Dickson, EUA) e incubadas por 18 h a 37 °C, em atmosfera aeróbica.

Para confirmar a inserção do *transposon*, as cepas passaram por uma triagem em duas etapas. Na primeira etapa, as colônias crescidas em ágar BHI foram simultaneamente semeadas em ágar BHI suplementado 10 µg ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EUA) e ágar BHI suplementado com 25 µg ml<sup>-1</sup> de eritromicina (Sigma-Aldrich, EUA). As cepas com crescimento positivo em BHI com cloranfenicol e crescimento negativo em BHI com eritromicina foram consideradas aptas para prosseguirem para a segunda parte da triagem (CHEN, et al., 2021).

Na segunda parte, a inserção do *transposon* foi confirmada por Reação de Cadeia Polimerase (PCR) de colônia, utilizando o *Gotaq® Green Master Mix kit* (Promega, EUA). De forma geral, para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes materiais: o *MasterMix* (proveniente do kit), 2 *primers* (cujo design será descrito a seguir), água livre de nuclease e uma colônia da cepa mutante correspondente. Para a confirmação da inserção do *transposon* em cada cepa mutante, foram utilizados 3 tipos de primers: *primer forward*, *primer reverse* e o *primer*

*transposon*. Todos os *primers* foram desenhados utilizando o *Oligoanalyzer tool* disponibilizado pela *Integrated DNA Technologies* (Coralville, EUA) e então fabricados pela mesma empresa. Os *primers forward* e *reverse* foram desenhados de 150 a 200 bases da localização inserção do *transposon* dentro do gene alvo, com temperatura de anelamento de aproximadamente 55 °C. Adicionalmente, um *primer* específico para sequência de nucleobases do *transposon* foi utilizado. A sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados no estudo está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de Nucleotídeos para *primers* utilizados para a confirmação da inserção dos *transposons* na região dos genes de interesse.

Locus alvo	Sequência de nucleotídeos <i>Primer forward</i>	Sequência de nucleotídeos <i>Primer reverse</i>
<b>OG1RF_10019</b>	5'-GTCAGAATCTGATTT ATCTGATTTTTTCA-3'	5'-GATTGCCCATTTGTCTTT ATGATCTTC -3'
<b>OG1RF_10020</b>	5'-CGCGTAACTCGC CAAATAC -3'	5'-GAACAAACCTGCAAC CGC-3'
<b>OG1RF_10021</b>	5'-GGCGTTCAACAT TTA TCC AAG G-3'	5'-CACCCATTGCTAAGG AAGCA-3'
<b>Sequência <i>primer</i> <i>Transposon</i></b>	5'-CTTCTCCTTTACTCATATGTATATCTCCGG-3'	

Os *primers* liofilizados foram primeiramente diluídos para estoque conforme suas instruções: os tubos foram centrifugados a 4000 g por 5 min e em seguida diluídos em água livre de nuclease para obtenção de soluções a 1 mM. Para serem utilizados nas reações de PCR, soluções de 20 mM de cada *primer* foram preparadas a partir do estoque. Para cada mutante, foram realizadas quatro reações de PCR como descrito na tabela 2.

As reações 1 e 2 validam a eficácia dos *primers forward* e *reverse* na cepa *Wild-type* e mutante, enquanto uma das reações 2 e 3 confirma a presença do *transposon* na cepa mutante. Em seguida, as reações foram conduzidas em termociclador t100™ *Thermacycler* (Bio Rad, Cingapura), seguindo as especificações descritas a seguir: Desnaturação inicial (98 °C, 3 min), Desnaturação (95 °C, 30 segundos), Anelamento (55/55.7/56.9/58.8/61.1/63/64.3/65 °C, 30 segundos), extensão (72 °C, 4 min), repetir ciclos a partir da desnaturação 34 vezes, Extensão final (72°C, 10 min).

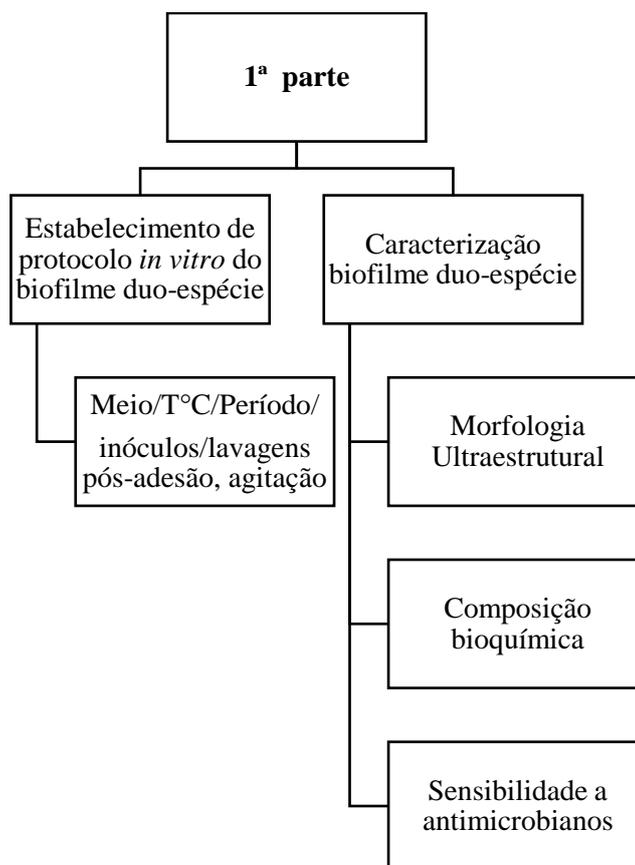
Os produtos amplificados da reação de PCR foram então revelados por

eletroforese em gel 0,8% de agarose (Fisher, EUA) em solução tampão Tris, ácido acético e EDTA (TAE, EUA) 1x acrescido de 0,01 % de SYBR™ Safe DNA gel stain (Invitrogen, EUA) foi preparado e distribuído em cuba para eletroforese. 1,5 µl de cada produto de PCR foram acrescidos no gel, juntamente com 1,5 µl marcador de peso molecular de 0,5 µg µl<sup>-1</sup> (GeneRuler DNA-Ladder, EUA). Em seguida, os géis foram submetidos a corrente elétrica de 100 V por 20 min. As imagens dos géis foram obtidas e fotografadas em câmera leitora de gel (DNA gel imagers, Analytik-Jena, Alemanha) utilizando filtro UV, com luz azul para brometo de etídio). A presença de bandas nos géis para produtos de PCR que receberam *primer forward* mais *transposon primer* ou *primer reverse* mais *transposon primer* confirmam a presença do *transposon*.

Tabela 2. Reações de PCR para a confirmação da inserção do *transposon*

<b>1</b> <b>1 amostra (reação de 25 µl)</b>	<b>2</b> <b>1 amostra (reação de 25µl)</b>	<b>3</b> <b>1 amostra (reação de 25µl)</b>	<b>4</b> <b>1 amostra (reação de 25µl)</b>
-12,5 µL do PCR Master Mix -0,5 µL de <i>Primer forward</i> (20 µM) -0,5 µL de <i>Primer reverse</i> (20 µM) -11,5 µL de água livre de nucleases -Colônia da Cepa <i>wild-type</i>	-12,5 µL do PCR Master Mix -0,5 µL de <i>Primer forward</i> (20 µM) -0,5 µL de <i>Primer reverse</i> (20 µM) -11,5 µL de água livre de nucleases -Colônia da Cepa mutante correspondente	-12,5 µL do PCR Master Mix -0,5 µL de <i>Primer forward</i> (20 µM) -0,5 µL de <i>Primer transposon</i> (20 µM) -11,5 µL de água livre de nucleases -Colônia da Cepa mutante correspondente	-12,5 µL do PCR Master Mix -0,5 µL de <i>Primer reverse</i> (20 µM) -0,5µL de <i>Primer transposon</i> (20 µM) -11,5 µL de água livre de nucleases -Colônia da Cepa mutante correspondente

## 5.5 Parte Experimental I



**Figura 5.** Organograma Experimental da parte I do presente estudo.

### 5.5.1 Formação dos biofilmes

Objetivando otimizar a formação do biofilme duo-espécie, o crescimento dos biofilmes foi avaliado em dois meios diferentes, BHI e RPMI 1640 (Merck, Alemanha), a duas temperaturas diferentes, 35 °C e 37 °C, por 24 h, 48 h ou 72 h. Colônias de *E. faecalis* crescidas ágar Mitis Salivarius e colônias de *C. albicans* crescidas em Sabouraud com cloranfenicol, foram transferidas para caldo BHI ou caldo *Yeast Nitrogen Base 5 %* dextrose, respectivamente. As culturas foram mantidas a 37 °C, por 18 h.

Depois disso, as células foram colhidas por centrifugação a 1591 g durante 5 min a 4 °C, e então lavadas duas vezes com solução tampão fosfato salino (PBS) estéril. Neste momento, diferentes meios, temperaturas e períodos de formação de biofilmes foram testadas. *Pellets* foram suspensos em caldo BHI ou caldo RPMI para cada micro-organismo, separadamente. Em seguida, as suspensões foram ajustadas

para turbidez de 0.5 da escala McFarland, equivalente a densidade celular de  $1,5 \times 10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente (DIOGO et al., 2017). Alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  de cada suspensão microbiana (proporção 1:1) foram transferidas para placas de 96 poços de fundo chato e incubadas tanto a 35 °C ou 37 °C por 24 h, 48 h ou 72 h (PANARIELLO et al., 2016) em atmosfera de microaerofilia, utilizando o método da jarra e vela. Os meios de cultura foram renovados diariamente removendo cuidadosamente o meio antigo, sem danificar o biofilme no fundo dos poços, e renovando-os com meio fresco. Condições físico-químicas que permitiram uma máxima biomassa e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para *E. faecalis* e *C. albicans* foram escolhidas para posterior caracterização dos biofilmes. Seguindo o mesmo protocolo, biofilmes monoespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* também foram analisadas utilizando suas suspensões microbianas ajustadas e cultivadas separadamente.

A partir deste momento, as análises foram realizadas apenas de biofilmes formados em BHI por 48 h. Os biofilmes foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em BHI, e diferentes protocolos relacionados com adesão microbiana e agitação foram investigados. O primeiro grupo experimental (protocolo 1) recebeu ambas as suspensões de *E. faecalis* e *C. albicans* simultaneamente nos poços. Após 3 h de incubação, os poços foram lavados com PBS para remover as células não aderidas e então reabastecidas com caldo BHI. O segundo grupo experimental (protocolo 2) primeiro recebeu a suspensão de *C. albicans* e, após 3 h de incubação, a suspensão de *E. faecalis* foi adicionada. O terceiro grupo experimental (protocolo 3) primeiro recebeu a suspensão de *C. albicans* e, após 3 h de incubação, os poços foram lavados com PBS para remover as células não aderidas e a suspensão de *E. faecalis* foi adicionada. As placas nos protocolos 1, 2 e 3 foram mantidas em condições estáticas. O quarto grupo experimental (protocolo 4) recebeu ambas as suspensões de *E. faecalis* e *C. albicans* simultaneamente nos poços, sem lavagem pós-adesão e incubadas sob agitação (9 g).

Todas as placas foram incubadas por 48 h em atmosfera de microaerofilia, utilizando o método da jarra e vela a 35 °C. O caldo BHI foi renovado diariamente removendo cuidadosamente o meio antigo, sem danificar o biofilme no fundo dos poços, e renovando-os com meio fresco. O grupo controle recebeu ambas as suspensões microbianas simultaneamente, sem lavagem pós-adesão e incubada em atmosfera de microaerofilia, sem agitação a 35 °C. Após 48 h, os biofilmes foram

avaliados em sua biomassa e contagem de ufc em ágar *Mitis Salivarius* ou ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol, como descrito a seguir.

### **5.5.2 Ensaio de cristal violeta para quantificação da Biomassa**

A biomassa dos biofilmes foi quantificada através do ensaio de cristal violeta, como descrito anteriormente (DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2015). Os biofilmes maduros formados em placas de 96 poços de fundo chato foram fixados com 200 µl de metanol 99 % (Sigma-Aldrich, EUA). Após 5 min, o metanol foi removido, os poços secos a temperatura ambiente, e então, 200 µl de cristal violeta 3 % (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionadas aos poços, seguidos por incubação de 20 min. O cristal violeta foi removido e os poços lavados duas vezes com 200 µl água destilada. Por fim, 200 µl de ácido acético 33 % (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados aos poços para solubilizar o cristal violeta. A absorbância foi lida a 590 nm usando espectrofotômetro. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

### **5.5.3 Contagem de unidades formadoras de colônia**

A viabilidade celular dos dois micro-organismos presentes no biofilme foi analisada por contagem de unidades formadoras de colônia (ufc). Após remover o meio de cultura, os biofilmes maduros formados na placa de 96 poços de fundo chato receberam 200 µl de solução salina estéril e foram raspadas do fundo dos poços usando ponteiros de micro titulação. As suspensões microbianas foram então transferidas para tubos estéreis e diluições seriadas foram realizadas em solução salina estéril. A contagem de colônias foi realizada em ágar *Mitis salivarius* e ágar Sabouraud com cloranfenicol para recuperação de *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. Placas foram cobertas e seladas com Parafilm M® (Merck, Alemanha), e incubadas em atmosfera de microaerofilia a 35 °C ou 37 °C, por 24 h, dependendo do protocolo testado. Então, as colônias foram quantificadas e os números de ufc determinados. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas (DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2015)

#### 5.5.4 *Morfologia ultraestrutural*

Para Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia Confocal a Laser de varredura (MCLV), biofilmes foram formados sobre superfície de lâminas *Thermanox* (Thermo Fisher Scientific, EUA) colocadas em placas de 24 poços, em atmosfera de microaerofilia por 48 h. Após isso, o meio de cultura foi removido e os biofilmes foram lavados uma vez com solução salina estéril.

Para análise de MEV, os biofilmes foram fixados com glutaraldeído (Dinâmica, Brasil) a 2,5 % em tampão de cacodilato de sódio (Dinâmica, Brasil) a 0,15 M contendo azul alciano a 0,1 % (Dinâmica, Brasil) e incubados por 18 h a 4 °C. Em seguida, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato a 0,15 M por 5 min e então submetidos a desidratação alcóolica em etanol 50, 70, 80, 95, e 100 % (duas vezes, 10 min cada). Em sequência, as lâminas foram secas com hexametildissilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 min e incubados por 18h em dessecador. As lâminas foram então cobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T, Reino Unido) e observadas através de MEV (FEI Inspect S50, EUA) em modo alta-vácuo a 15 Kv (DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2015).

Para MCLV, os biofilmes formados foram corados com *LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit* (Invitrogen, EUA) contendo SYTO 9 e Iodeto e propídio. As imagens foram realizadas com séries de secções ópticas com espessura de 0,8 µm com intervalos de 0,31 µm ao longo da profundidade do biofilme em microscópio confocal Nikon C2+ (Nikon, Japão), com magnificação de 600 x. Para análise das imagens, imagens tridimensionais de sete pontos equidistantes e quantificação colorimétrica foram executadas com *Z-slices*, utilizando *software ImageJ 1.50i* (COLLINS, 2007). Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

#### 5.5.5 *Composição bioquímica dos biofilmes duo-espécie*

A quantificação de carboidratos dos biofilmes foi realizada utilizando *CalcoFluor White* (Sigma-Aldrich, EUA), como descrito por Clark et al. (2018), Vermelho de Congo (Sigma-Aldrich, EUA), como descrito por Bazzini et al., (2011) e Safranina, como descrito anteriormente (LEUCK; JOHNSON; DUNNY, 2014). A

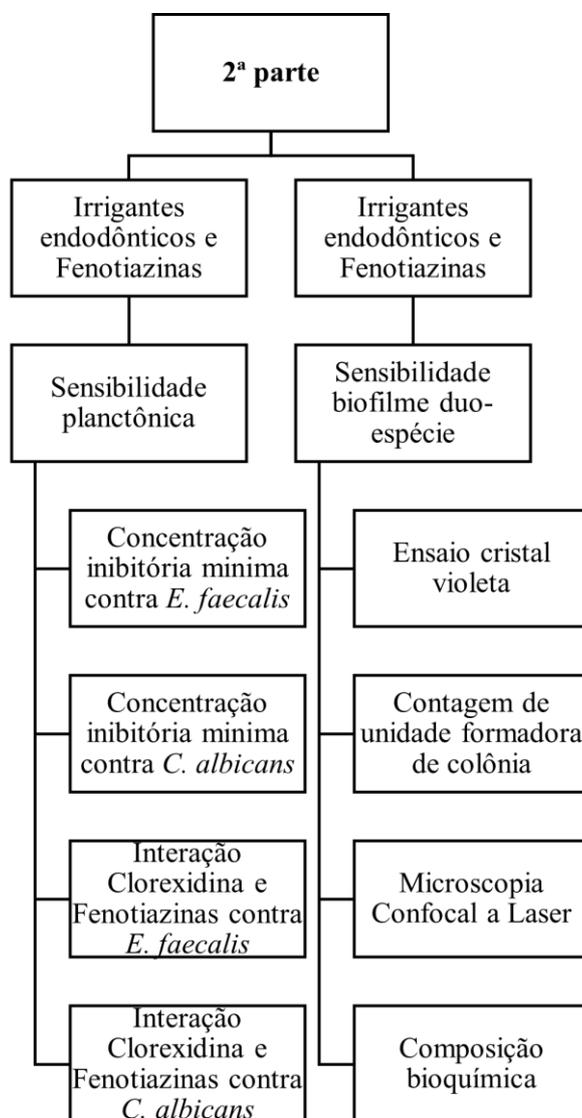
quantificação de proteínas foi realizada com *SYPRO*® *RUBY* (Sigma-Aldrich, EUA), baseado em análises anteriores (MOHAMMED et al., 2013), com modificações.

Após a formação dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com PBS e então *CalcoFluor White* a 1 %, Vermelho de congo a 0,1 %, Safranina a 0,1 %, ou *SYPRO RUBY* foram adicionados. Após 10 min longe da luz, os poços foram lavados duas vezes com água Mili-Q e então homogeneizadas. As leituras de *CalcoFluor White* e *SYPRO RUBY* foram realizadas em dispositivo *Cytation 3* (Biotek, EUA) a 430 nm/510 nm e 465 nm/630 nm, respectivamente. As leituras de Vermelho de Congo e Safranina foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm e 630 nm respectivamente. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

#### **5.5.6 Resistência antimicrobiana do biofilme duo-espécie**

Foram avaliados o efeito inibitório de anfotericina B (AMB, Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  baseado em Tobudic *et al.*, (2009), assim como também o efeito inibitório de vancomicina na concentração de 32  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  baseado em Laplante e Mermel (2009). Após a formação dos biofilmes em placas de 96 poços em BHI, por 48 h a 35 °C em atmosfera de microaerofilia sem agitação, o meio foi cuidadosamente removido e os antimicrobianos adicionados nos poços. As placas foram incubadas por mais 24 h a 35 °C em atmosfera de microaerofilia (CORDEIRO, et al., 2017) e em seguida submetidas aos ensaios de cristal violeta de ufc como descrito anteriormente.

## 5.6 Parte Experimental II



**Figura 6.** Organograma Experimental da parte 2 do presente estudo

### 5.6.1 Ensaio de sensibilidade antimicrobiana contra crescimento planctônico

O ensaio de sensibilidade antimicrobiana contra células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans* foi realizado pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96-poços de fundo em “U”, de acordo com o documento M07 (CLSI, 2022a) e M27-A3 (CLSI, 2022b), respectivamente. Hipoclorito de Sódio (NaClO; Clororio, Brasil), clorexidina aquosa (CHX; Farmácia Escola UFC, Brasil), cloridrato de

prometazina injetável (PMZ; Cristalia, Brasil) e cloridrato de clorpromazina injetável (CPZ; Cristalia, Brasil) foram diluídos em caldo Mueller Hinton (Sigma-Aldrich, EUA) e caldo RPMI (Merck, Alemanha), para *E. faecalis* e *C. albicans* respectivamente, como descrito a seguir: NaClO (19,5-10000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), CHX (0,0625-32  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), PMZ (1-512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). VAN e AMB também foram testados contra *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente, como drogas-controle (CLSI, 2022a,b). Os inóculos foram preparados de culturas previamente cultivadas em ágar Mitis Salivarius para *E. faecalis* e ágar Sabouraud Dextrose para *C. albicans* por 24 h a 37 °C. Suspensões microbianas foram preparadas em solução salina estéril até atingir  $5 \times 10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  e  $2,5 \times 10^3$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  para *E. faecalis* e *C. albicans* respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a mais baixa concentração capaz de inibir 100 % do crescimento microbiano após 24 h de incubação a 35-37 °C (GALGÓCZY et al., 2011; RAHBAR; MEHRGAN; HADJI-NEJAD, 2010). Os experimentos foram repetidos em dois momentos individuais, com duas replicatas técnicas.

### **5.6.2 Ensaio de “Chequerboard” de clorexidina com as fenotiazinas prometazina e clorpromazina**

O ensaio de interação entre as substâncias foi executado conforme Odds (2003) a fim de avaliar a interação entre CHX e as fenotiazinas. Diversas combinações de concentrações de CHX (0,15625 – 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) e PMZ (1-512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ou CPZ (0,25-500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) diluídas em caldo Mueller Hinton ou caldo RPMI foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em “U”, inoculadas com suspensão microbiana de *E. faecalis* ( $5 \times 10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) e *C. albicans* ( $2,5 \times 10^3$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), e incubadas a 35-37 °C por 24 h. A inibição de 100 % do crescimento microbiano foi utilizada como referência. A interação entre as drogas foi determinada com base do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF), sendo classificada como sinergismo (ICIF < 0,5); antagonismo (ICIF > 4) ou sem interação (ICIF=0,5-4). Os experimentos foram repetidos em dois momentos individuais, com duas replicatas técnicas.

### **5.6.3 Formação de biofilme**

A formação de biofilmes foi realizada baseado no protocolo otimizado na

parte I do desenho experimental do presente estudo (DE MELLO FIALLOS et al., 2022). Colônias de *E. faecalis* crescidas em ágar Mitis Salivarius e colônias de *C. albicans* crescidas em Sabouraud com cloranfenicol, foram transferidas para caldo BHI ou caldo *Yeast Nitrogen Base 5 %* dextrose, para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. As culturas foram mantidas a 37 °C por 18 h e em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 1591 g durante 5 min a 4 °C; os precipitados foram lavados duas vezes com PBS estéril e então resuspenso em caldo BHI. Em seguida, as suspensões foram ajustadas para turbidez de 0,5 da escala McFarland, equivalente à densidade celular de  $1,5 \times 10^8$  células ml<sup>-1</sup> para *E. faecalis*  $1,0 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup> para *C. albicans*, respectivamente (DIOGO et al., 2017). Aliquotas de 100 µl de cada suspensão microbiana (proporção 1:1) foram transferidas para placas de 96 poços de fundo chato e incubadas tanto a 35 °C por 48 h em atmosfera de microaerofilia, utilizando o método da jarra e vela. Os meios de cultura foram renovados diariamente removendo cuidadosamente o meio antigo, sem danificar o biofilme no fundo dos poços, e renovando-os com meio fresco.

#### **5.6.4 Ensaios antibiofilme**

Os ensaios antibiofilme foram executados testando NaClO, CHX, PMZ, CPZ, PMZ+CHX e CPZ+CHX contra os biofilmes duo-espécie. As concentrações de 25 mg ml<sup>-1</sup> (2,5 %) de NaClO e 2 mg ml<sup>-1</sup> (2 %) de CHX foram escolhidos baseado na seu documentado uso na prática endodôntica (DIOGUARDI; QUARTA; et al., 2020). Concentrações de PMZ, CPZ, PMZ+CHX e CPZ+CHX foram baseadas em dez vezes o valor de CIM para cada droga contra *E. faecalis* e *C. albicans* planctônicos (MAH, 2012), como descrito a seguir PMZ, 1,280 mg ml<sup>-1</sup>; CPZ, 0,5 mg ml<sup>-1</sup>; PMZ + CHX, 0,080 mg ml<sup>-1</sup>+0,020 mg ml<sup>-1</sup>; CPZ +CHX, 0,125 mg ml<sup>-1</sup>+0,020 mg ml<sup>-1</sup>. Grupos controle foram tratados com PBS estéril. Após 48 h de formação do biofilme, o meio de cultura foi removido cuidadosamente, poços lavados uma vez com PBS estéril, e então 200 µl de cada substância testada foi adicionada. Após 10 min, objetivando simular o tempo que irrigantes endodônticas permanecem no interior do canal durante o tratamento endodôntico (BUKHARY; BALTO, 2017), as soluções foram removidas dos poços. Os grupos tratados com NaClO receberam tratamento adicional com tiosulfato de sódio a 10 % (Dinâmica, Brasil) por 10 min e os outros grupos receberam mais uma lavagem de PBS, objetivando pausar os efeitos antimicrobianos

(BUKHARY; BALTO, 2017). O efeito antibiofilme de cada substância testada foi avaliada como descrito nos tópicos 5.5.5, 5.5.6, 5.5.7 e 5.5.8.

#### **5.6.5 Ensaio de Contagem de Unidades Formadoras de Colônia**

A viabilidade celular de *E. faecalis* e *C. albicans* em biofilmes duo-espécie foi avaliada utilizando o ensaio de ufc. Depois do tratamento com as substâncias testadas como descrito anteriormente, os biofilmes formados em placas de 96 poços de fundo chato receberam 200 µl de solução salina e foram raspadas do fundo dos poços usando ponteiros de micro titulação. As suspensões microbianas foram então transferidas para tubos estéreis e diluições seriadas foram realizadas em solução salina estéril. A contagem de colônias foi realizada em ágar Mitis salivarius e ágar Sabouraud com cloranfenicol para recuperação de *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. Placas foram cobertas e seladas com Parafilm M® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), e incubadas em atmosfera de microaerofilia a 35 °C ou 37 °C, por 24 h, dependendo do protocolo testado. Então, as colônias foram quantificadas e os números de ufc determinados. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

#### **5.6.6 Ensaio de cristal violeta**

A biomassa dos biofilmes foi quantificada através do ensaio de cristal violeta, como descrito anteriormente (AGUIAR CORDEIRO, *et al.*, 2015). Depois do tratamento com as substâncias testadas como descrito anteriormente, os biofilmes formados em placas de 96 poços de fundo chato foram fixados com 200 µl de metanol 99 % (Sigma-Aldrich, Minnesota, EUA). Após 5 min, o metanol foi removido, os poços secos a temperatura ambiente, e então, 200 µl de cristal violeta 3 % (Sigma-Aldrich, Minnesota, EUA) foram adicionadas aos poços, seguidos por incubação de 20 min. O cristal violeta foi então removido e os poços lavados duas vezes com 200 µl água destilada. Por fim, de ácido acético 33 % (Sigma-Aldrich, Minnesota, EUA) foram adicionados aos poços para solubilizar o cristal violeta. A absorbância foi lida a 590 nm usando espectrofotômetro. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

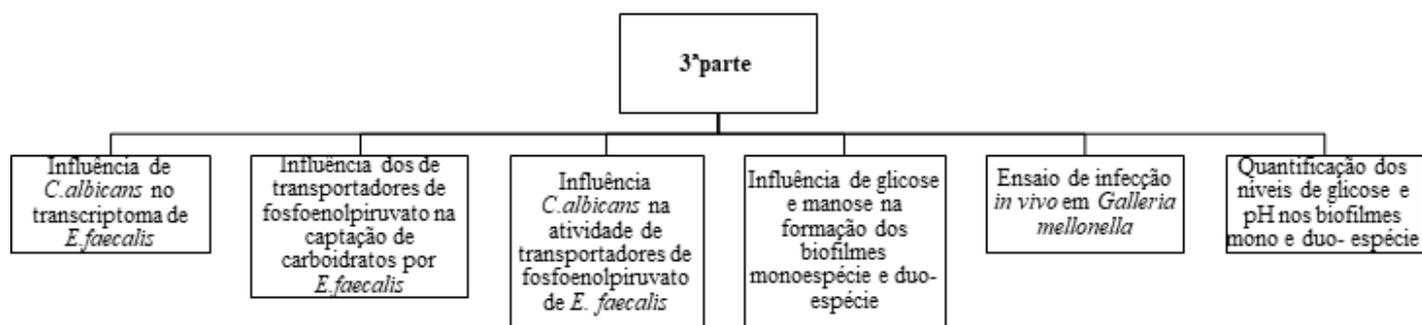
### 5.6.7 *Microscopia confocal a laser*

Para MCLV, biofilmes foram formadas sobre superfície de lâminas *Thermanox* (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, EUA) colocadas em placas de 24 poços, em atmosfera de microaerofilia por 48 h. Após isso, os biofilmes foram tratados com as substâncias testadas como descrito anteriormente e então corados com *LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit* (Invitrogen, California, EUA) contendo *SYTO 9* e Iodeto e propídio. Imagem fora realizadas com séries de secções ópticas com espessura de 0,8 µm com intervalos de 0,31 µm ao longo da profundidade do biofilme em microscópio confocal Nikon C2+ (Nikon, Tóquio Japão), com magnificação de 600 x. Para análise das imagens, imagens tridimensionais de sete pontos equidistantes e quantificação colorimétrica foram executadas com *Z-slices*, utilizando *software ImageJ 1.50i* (COLLINS, 2007). Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

### 5.6.8 *Composição bioquímica dos biofilmes*

A quantificação de carboidratos dos biofilmes após o tratamento antibiofilme com as substâncias testada foi realizada utilizando *CalcoFluor-white*, como descrito por Clark et al. (2018), Vermelho de Congo, como descrito por Bazzini et al. (2011) e Safranina, como descrito por Leuck, Johnson e Dunny (2014). A quantificação de proteínas foi realizada com *SYPRO® RUBY*, baseado em Mohammed et al., (2013) com modificações. Após a formação dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com PBS e então *CalcoFluor White* a 1 %, Vermelho de Congo a 0,1 %, Safranina a 0,1 %, ou *SYPRO RUBY* foram adicionados. Após 10 min longe da luz, os poços foram lavados duas vezes com água Mili-Q e então homogeneizados. As leituras de *CalcoFluor White* e *SYPRO RUBY* foram realizadas em dispositivo *Cytation 3* (Biotek, EUA) a 430 nm/510 nm e 465 nm/630 nm, respectivamente. As leituras de Vermelho de Congo e Safranina foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm e 630 nm respectivamente. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

## 5.7 Desenho Experimental Parte III



**Figura 7.** Organograma Experimental da parte 3 do presente estudo

### 5.7.1 Formação do biofilme

A formação de biofilmes foi realizada baseada no protocolo otimizado na parte I do desenho experimental do presente estudo (FIALLOS, *et al.*, 2022), com algumas modificações. Colônias de *E. faecalis* crescidas em ágar Mitis Salivarius e colônias de *C. albicans* crescidas em Sabouraud com cloranfenicol, foram transferidas para caldo BHI ou caldo *Yeast Peptone dextrose*), para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. As culturas foram mantidas a 37 °C por 18 h. Depois disso, as células foram colhidas por centrifugação a 1591 g durante 5 min a 4 °C, lavadas duas vezes com PBS estéril e então os pellets foram suspensos em caldo BHI com 20 mM de Glicose. Em seguida, as suspensões foram ajustadas para densidade óptica de 0,5 para *E. faecalis* e 0,3 para *C. albicans*, equivalente a densidade celular de  $3 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$  para *E. faecalis* e  $2,5 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para *C. albicans*. Aliquotas de cada suspensão microbiana (proporção 1:1) foram transferidas para placas de fundo chato e incubadas a 35 °C por 48 h em estufa com atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$ . Os meios de cultura foram renovados diariamente removendo cuidadosamente o meio antigo, sem

danificar o biofilme no fundo dos poços, e renovando-os com meio fresco. Seguindo o mesmo protocolo, biofilmes monoespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* também foram formadas utilizando suas suspensões microbianas ajustadas e cultivadas separadamente.

## 5.7.2 Sequenciamento de RNA

### 5.7.2.1 Extração do RNA

O sequenciamento de RNA de *E. faecalis* foi realizado com o micro-organismo em duas condições de cultivo: em biofilme monoespécie e em biofilme duo espécie com *C. albicans*, conforme os grupos experimentais abaixo, em triplicata:

- *E. faecalis* em biofilme monoespécie
- *E. faecalis* em biofilme duo-espécie

Biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* OG1RF *wild type* e *C. albicans* SC5134 *wild type* e biofilmes monoespécie de *E. faecalis* OG1RF *wild type* foram cultivados como descritos anteriormente, utilizando placas de 6 poços de fundo chato, em triplicata. Cada poço do biofilme monoespécie recebeu de 5 ml de suspensão bacteriana, enquanto os poços do biofilmes duo-espécie receberam 2,5 ml de suspensão bacteriana mais 2,5 ml de suspensão fúngica. Cada triplicata técnica obteve um total de 30 ml de suspensão microbiana ao somar o volume de todos os seus poços correspondentes, ou seja, cada placa de 6 poços com 5ml de suspensão em cada poços correspondeu a uma triplicata.

Após a formação dos biofilmes, todo o meio de cultura foi gentilmente removido dos poços e 1 ml de *RNA Protect® Bacterial Reagent* (Qiagen, Alemanha) foi adicionado em cada poço. Os biofilmes foram raspados do fundo dos poços utilizando raspador de células (Falcon, México), homogeneizados e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 30 ml de suspensão microbiana correspondente a cada triplicata foram transferidos para tubos cônicos de 50 ml e então centrifugados a 1500 g, por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e 1ml de *RNA Protect® Bacterial Reagent* foi adicionado aos *pellets*. Os *pellets* foram agitados em vórtex até sua dissolução e então sua suspensão foi transferida para

microtubos de 1,5 ml. Os microtubos foram centrifugados a 6000 g, 5 min a 4 °C, seus sobrenadantes resultantes descartados e os *pellets* foram em seguidas estocados a -80 °C.

A lise celular foi realizada utilizando solução de Lisozima derivado ovo de galináceo (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 10 mg ml<sup>-1</sup> em *RNA Protect*®. 1ml da solução foi adicionado a cada *pellet*, as suspensões foram agitadas por *vórtex* até dissolução do *pellet* e obtenção de suspensão homogênea, e então incubadas a 37 °C por 30 min. A cada 10 min de incubação, as suspensões receberam agitação adicional. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1200 g por 5 min 4 °C e o sobrenadante resultante foi descartado. Para as etapas seguintes da extração de RNA, foi utilizado o kit de extração de RNA por coluna *RNA-Purelink kit* (Thermo Fisher, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O *Lysis buffer* foi preparado adicionando 10 µl de 2-mercaptoetanol a 99 % (Thermo Fisher, EUA) para cada 1 ml do *buffer*. 600 µl da solução foi então adicionada para cada amostra contendo o *pellet* que foram em seguida agitadas em *vórtex* até sua dissolução e células aparentarem lise.

Para formação do precipitado, 600 µl etanol a 70 % em água livre de nuclease foi adicionado a cada lisado que em seguida foram agitadas em *vórtex* vigorosamente até dispersar qualquer precipitado que possa ser formado. Passando para a etapa de ligação de RNA, 700 µl da solução foram transferidos para a coluna de ligação de RNA adaptada a um tubo coletor e centrifugados a 1200 g por 15 segundos. A suspensão transferida para o tubo coletor foi descartada esse último reinsertado na coluna. Os passos para ligação do RNA à membrana da coluna foram repetidos até todo o processamento de cada amostra. Para eliminação de material de DNA das amostras, foi utilizado o kit *RNAase-free DNAase on column* (Qiagen, Alemanha). Cada amostra na coluna recebeu 10 µl de DNAase e 70 µl de *RDD Buffer* e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos.

Após o tratamento com DNAase, as amostras na coluna foram lavadas com *Wash Buffer I* e *Wash Buffer II* seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, para secagem da membrana contendo o RNA, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 2 minutos. O tubo coletor foi então substituído por um tubo de recuperação, 50 µl de água livre de nuclease foi adicionada no centro da membrana e incubadas por 1 minuto. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 1200 g, as colunas retiradas dos tubos de recuperação que agora contém as amostras de RNA.

#### 5.7.2.2 Quantificação e diluição das amostras de RNA para análise

A quantificação de RNA das amostras foi realizada utilizando dispositivo *NanoDrop One* (Thermo Fisher, EUA). Para isso, foi utilizado água livre de nuclease como *blank* e 1,5 µl das amostras foi analisada. As amostras consideradas adequadas possuíram o valor de  $A_{260}/A_{280}$  superior a 2 e  $A_{260}/A_{230}$  próximo a 2. Em seguida, seguindo as recomendações do centro de sequenciamento, todas as amostras foram diluídas em 25 µl de água livre de nuclease para a concentração de 100 ng µl<sup>-1</sup> de RNA e estocadas a -80 °C.

#### 5.7.2.3 Sequenciamento do RNA

As amostras de RNA foram analisadas pelo *SeqCenter* (Pittsburg, EUA). Primeiramente, as amostras foram tratadas novamente com DNAase (Invitrogen, EUA). A preparação das bibliotecas foi realizada utilizando *Illumina's Stranded Total RNA Prep Ligation* com *Ribo-Zero Plus* kit e 10bp IDT para os índices *Illumina*. Adicionalmente, *probes* customizadas para ribodepleção de rRNA de *E. faecalis* e rRNA de *C. albicans* foram preparadas e utilizadas em todas as amostras. Para as amostras de *E. faecalis* em biofilme monoespécie 12 milhões de leituras foram geradas e para amostras de *E. faecalis* em biofilme duo espécie foram geradas 25 milhões de leituras. O sequenciamento foi realizado em *NextSeq2000*, fornecendo 2x50 leituras de bases. Demultiplexação, controle de qualidade e lapidação foram realizadas utilizando *software bcl-convert* (v 3.9.3).

#### 5.7.2.4 Análise dos dados do sequenciamento de RNA

O controle de qualidade e refino dos dados foi realizado com o *software bcl2fastq*. A leitura do mapeamento foi realizada com *software HISAT2*. A quantificação das leituras foi realizada utilizando o *software featureCounts*, funcionalmente. As contagens das leituras foram normalizadas utilizando o algoritmo

*edgeR's Trimmed Mean of M values*. Os valores foram então convertidos para contagens por milhão.

As contagens por milhão do transcriptoma das triplicatas de *E. faecalis* em monoespécie e do transcriptoma das triplicadas de *E. faecalis* em duo-espécie foram analisadas e comparado utilizando o *software Degust-Interactive RNAseq analysis* (POWELL, 2022). Para análise, a expressão gênica de *E. faecalis* em duo-espécie foi comparado com *E. faecalis* em monoespécie utilizando metodologia *Voom/Limma*. Os *cut-offs* para  $\log_2FC$  (*log-fold change*) foram =2.0 e para *FDR* (*false-discovery-rate*) = 0.05. As descrições dos genes identificados foram verificadas pelo banco de dados *Biocyc Database Collection*.

### **5.7.3 Ensaio de monitoramento de crescimento com restrição de carboidratos**

Com base nos resultados de RNAseq, foi detectado aumento de expressão gênica de óperon OG1RF\_10018, OG1RF\_10019, OG1RF\_10020 e OG1RF\_10021 relacionados com transportadores PTS. Para a avaliação da capacidade desses genes em influenciar a captação de carboidratos por *E. faecalis*, foi avaliado o crescimento bacteriano utilizando um único tipo de carboidrato em meio mínimo. Os seguintes açúcares foram utilizados: glicose (Fisher Bioreagents, EUA), manose (Fisher Bioreagents, EUA) e frutose (Fisher Bioreagents, EUA). Esses açúcares foram diluídos a 2.5 % em meio CDM (*chemically-defined-medium*), preparado conforme descrito anteriormente por Chang et al. (2011).

Para o preparo do inóculo, colônias de *E. faecalis* OG1RF *wild-type*, Tn::10019, Tn::10020 e Tn::10021 crescidas ágar *Mitis Salivarius* foram transferidas para caldo BHI e incubadas a 37 °C, por 18 h. Depois disso, as células foram colhidas por centrifugação a 1591 g durante 5 min a 4 °C, lavadas duas vezes com Solução tampão fosfato (PBS) estéril e então os pellets foram suspensos em CDM. Em seguida, as suspensões foram ajustadas para densidade óptica (OD) de 0,2. Placas *Bioscreen* (Thermo Labsystems, EUA) receberam 250 µl de CDM com 2,5 % de glicose, manose ou frutose. 2,5 µl dos inóculos bacterianos foram então adicionados aos poços correspondentes. Finalmente, as placas foram incubadas a 37 °C em dispositivo *Bioscreen C* (Thermo Labsystems, EUA), onde sua densidade óptica a 600nm foi monitorada a cada 30 min por 24 h, com agitação de 5 segundos antes de cada leitura.

Os experimentos foram realizados utilizados 3 replicatas técnicas e repetidos duas vezes.

#### **5.7.4 Ensaio de influência de glicose e manose na formação dos biofilmes**

A influência de manose e glicose na formação dos biofilmes foi investigada através da quantificação de sua biomassa e unidades formadoras de colônia dos biofilmes quando cultivados em meio CDM contendo como única fonte de carboidrato Glicose, manose ou ambos. Para isso, biofilmes monoespécie de *E. faecalis* OG1RF *wild-type* e *C. albicans* SC5134 *wild type* e biofilmes duo-espécie dos dois micro-organismos foram cultivados como descritos anteriormente, em meio BHI+20 mM Glicose, meio CDM+20 mM glicose, meio CDM+20 mM manose ou meio CDM+10 mM glicose+10 mM manose utilizando placas de 96 poços de fundo chato, em triplicata. Os biofilmes monoespécie foram cultivados utilizando 200 µl da suspensão microbiana correspondente, enquanto os biofilmes duo-espécie foram cultivados utilizando 100 µl de suspensão bacteriana e 100 µl de suspensão fúngica. Para análise dos biofilmes formados, foram realizados os ensaios de cristal violeta e contagem das unidades formadoras de colônia. Para o ensaio de cristal violeta, após o período de formação dos biofilmes, os meios foram gentilmente removidos dos poços e lavados duas vezes com 200 µl de PBS. Em seguida, 100 µl de cristal violeta a 0.1 % e incubados por 15 min. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e então diluídos e homogeneizados em 200 µl de ácido acético a 0,33 %. A leitura das placas foi realizada em leitor de placa *Synergy HI* (Biotek, EUA) com 575 nm de absorvância. Os experimentos foram realizados utilizados 3 replicatas técnicas e repetidos duas vezes.

Para o ensaio de contagem de unidades formadoras de colônia, os biofilmes formados em placas de 96 poços de fundo chato receberam 200 µl de solução salina e foram raspadas do fundo dos poços usando ponteiras de micro titulação. As suspensões microbianas foram então transferidas para placas de 96 poços e diluições seriadas foram realizadas em solução PBS. A contagem de colônias foi realizada em ágar Mitis salivarius e ágar Sabouraud com cloranfenicol para recuperação de *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. As placas foram incubadas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, por 24 h. Então, as colônias foram quantificadas e os números de ufc

determinados. Experimentos foram repetidos em dois momentos separados, com três replicatas técnicas.

#### **5.7.5 Ensaio de atividade dos transportadores PTS manose/frutose**

A influência de *C. albicans* na atividade dos transportadores PTS manose frutose de *E. faecalis* foi investigada. Para isso, foi realizado o ensaio de atividade de transportadores PTS como descrito anteriormente (LEBLANC et al., 1979). Biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* OG1RF *wil-type* ou OG1RF Tn::10019 com *C. albicans* SC5134 *wild type* e biofilmes monoespécie de *E. faecalis* OG1RF *wild type*, *E. faecalis* OG1RF Tn::10019 e *C. albicans* SC5134 *wild type* foram cultivados como descritos anteriormente, utilizando placas de 24 poços de fundo chato, em triplicata. Cada poço do biofilme monoespécie recebeu de 1 ml de suspensão bacteriana, enquanto os poços do biofilmes duo-espécie receberam 500 µl de suspensão bacteriana mais 500 µl de suspensão fúngica.

Após a formação dos biofilmes, todo o meio de cultura foi gentilmente removido e os biofilmes foram raspados do fundo dos poços utilizando raspador de células e homogeneizados por vórtex. 1 ml das suspensões foram transferidas para microtubos de 1,5 ml e centrifugados a 4000 g por 10 min a 4 °C, seus sobrenadantes resultantes descartados e os *pellets* foram congelados com gelo seco em seguidas estocados a -80 °C. Os pellets foram lavados duas vezes com tampão fosfato sódio potássio a 0.1 M (Fisher Bioreagents, EUA) e contendo 5mM de cloreto de magnésio (Fisher Bioreagents, EUA) e em seguida suspensos em 100 µl do mesmo tampão. A permeabilização das células foi realizada através da adição de 50 µl de solução tolueno-acetona (1:9) e agitadas em vórtex por dois ciclos de 2 minutos.

Para normalização dos dados da atividade dos transportadores PTS, um ensaio de quantificação proteica de ácido binciconínico (BCA, Sigma-Aldrich, EUA) das células permeabilizadas foi realizado para cada grupo experimental conforme as instruções do fabricante. Os componentes de cada reação incluíram 50 µl das células permeabilizadas, 100 µM de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, EUA), 10 mM de Fluoreto de sódio (Fisher Bioreagents, EUA) e, 10 mM de Manose ou Frutose, 10 mM L-LDL (L- Desidrogenase, Sigma-Aldrich, EUA), 0,1M de tampão fosfato sódio potássio e 5 mM de PEP (Sal monopotássico de ácido fosfoenolpirúvico, Sigma-

Aldrich, EUA). As reações foram incubadas a 37 °C e as taxas de oxidação de NADH foram monitoradas em espectrofotômetro ao longo do tempo (densidade óptica de 340 nm, leituras a cada 10 segundos, por 2 min e 30 segundos).

A atividade dos transportadores PTS foi calculada da taxa de oxidação de NADH dependente de PEP ( $\Delta 340/\text{min}$ ) e normalizada para a concentração proteica determinada pelo ensaio de ácido bicinonínico (BCA). A oxidação de NADH dependente de PEP de biofilmes monoespécie de *C. albicans* foi calculada e subtraída da atividade dos transportadores PTS no biofilme duo-espécie.

### 5.7.6 *Quantificação de glicose e mensuração de pH dos biofilmes*

A fim de caracterizar o comportamento metabólico dos micro-organismos, biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* OG1RF *wil-type* e *C. albicans* SC5134 *wild type* e biofilmes monoespécie de *E. faecalis* OG1RF *wild type* e *C. albicans* SC5134 *wild type* foram cultivados como descritos anteriormente, utilizando placas de 24 poços de fundo chato, em triplicata. Cada poço do biofilme monoespécie recebeu de 1 ml de suspensão bacteriana, enquanto os poços do biofilmes duo-espécie receberam 500  $\mu\text{l}$  de suspensão bacteriana mais 500  $\mu\text{l}$  de suspensão fúngica. Após sua formação, biofilmes foram raspados do fundo dos poços utilizando raspador de células e homogeneizados. 1 ml das suspensões foram transferidas para *microtubos* de 1,5 e centrifugados a 4000 g por 10 min a 4°C, seus sobrenadantes resultantes foram filtrados utilizando filtro 0,2 $\mu\text{m}$  (Cole-Palmer, EUA) e estocados a -80 °C.

A quantificação da glicose dos sobrenadantes foi realizada utilizando o *Glucose -HK-assay kit* (Sigma-Aldrich, EUA), segundo as instruções do fabricante. 1ml do reagente foi adicionado a 200  $\mu\text{l}$  das amostras que foram então incubadas a 37 °C por 15 min. Uma curva padrão de concentração de glicose versus absorvância foi preparada simultaneamente. Após a incubação, 100  $\mu\text{l}$  produto das reações foram transferidos para placas de 96 poços e lidos a 340 nm. Os valores de absorvância foram correlacionados com os valores da curva de padrão de glicose para determinação da concentração de glicose das amostras.

### 5.7.7 *Ensaio de infecção in vivo em invertebrado Galleria mellonella*

Foi avaliada a taxa de sobrevivência de *Galleria mellonella* após infecção por *E. faecalis*, *C. albicans* e pelos dois micro-organismos em coinfeção, utilizando os seguintes grupos experimentais:

- Mono infecção por *E. faecalis*
- Mono infecção por *C. albicans*
- Coinfecção por *E. faecalis* e *C. albicans*
- *E. faecalis* mortos por ebulição
- *C. albicans* mortos por ebulição

Larvas de *G. mellonella* foram obtidas do *Snackworms* (Saint Marys, EUA), com temperaturas acima de 30 °C. As larvas entregues com peso entre 0,2 g e 0,3 g foram selecionadas para o ensaio, separadas em cinco grupos contendo 60 larvas cada (n=60) e estocadas a 4 °C até seu uso.

Para o preparo do inóculo, colônias de *E. faecalis* crescidas em ágar Mitis Salivarius e colônias de *C. albicans* crescidas em Sabouraud com cloranfenicol, foram transferidas para caldo BHI ou caldo *Yeast Peptone Dextrose* para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. As culturas foram mantidas a 37 °C por 18 h. Depois disso, as células foram colhidas por centrifugação a 1591 g durante 5 min a 4 °C, lavadas duas vezes com Solução PBS estéril e então os *pellets* foram suspensos em caldo BHI com 20 mM de glicose. Em seguida, as suspensões foram ajustadas para densidade óptica de 0,5 para *E. faecalis* e 0,5 para *C. albicans*, equivalente a densidade celular de  $3 \times 10^9$  células ml<sup>-1</sup> para *E. faecalis* e  $2.5 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup> para *C. albicans*. As suspensões de *E. faecalis* foram diluídas em Solução Salina 0,9% em proporção 1:100 para obtenção de concentração  $3 \times 10^7$  células ml<sup>-1</sup> enquanto as suspensões de *C. albicans* foram concentradas em Solução Salina 0,9 % em proporção 10x para obtenção de concentração  $2.5 \times 10^7$  células ml<sup>-1</sup>. Para obtenção das suspensões *E. faecalis* e *C. albicans* mortas por ebulição, os inóculos bacteriano e fúngico foram preparados como descrito anteriormente e fervidos por 45 min. Para a infecção das larvas, essas foram incubadas a 4 °C por 5 min e depois receberam injeção de 5 µl em suas patas traseiras esquerdas e incubadas a 37 °C em placas de *petri* contendo raspas de madeira. A probabilidade de sobrevivência das larvas foi monitorada a cada 24 h por 72 h.

## 5.8 Análise Estatística

Dados paramétricos foram analisados utilizando *one-way analysis of variance* (ANOVA) seguido por *Turkey's post-hoc test*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software Graphpad prism 7.0* (GraphPad Software, EUA). A análise estatística dos ensaios *in vivo* foi realizada utilizando *long-rank test* em *GraphPad Prism 7.0*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Parte Experimental I

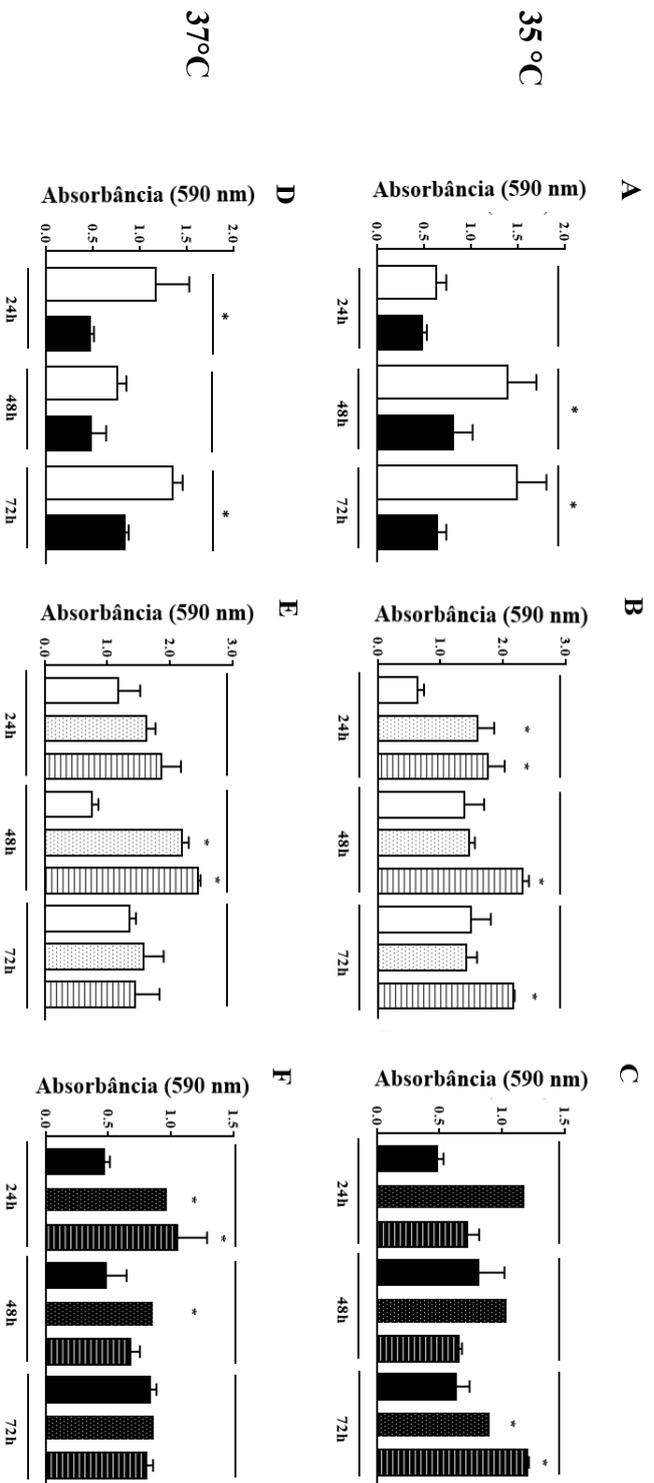
#### 6.1.1 Formação do biofilme

Biofilmes formados em caldo BHI apresentaram maior biomassa do que os formados em caldo RPMI (Figuras 8A-8F). De uma forma geral, biofilmes duo-espécies formados em caldo BHI apresentaram maior biomassa do que os formados em caldo RPMI, independentemente da temperatura de cultivo (Figuras 8A, 8D). Biofilmes monoespécie demonstraram maior biomassa do que biofilmes duo-espécie, independentemente do meio de cultivo ou temperatura, portanto a relação de mutualismo não foi detectada entre *E. faecalis* e *C. albicans* (Figuras 8B, 8C, 8E,8F). Biofilmes formados em BHI, a 35 °C por 48 h ou 72 h mostraram os maiores níveis de biomassa entre os protocolos testados. A contagem de unidades de colônia revelou que em biofilme duo-espécie *E. faecalis* cresceu melhor em caldo BHI a 35 °C ou 37 °C (Figuras 9A, 9E), enquanto *C. albicans* cresceu melhor em caldo RPMI a 37 °C (Figuras 9G). Biofilmes monoespécie de *E. faecalis* cresceram melhor em caldo BHI do que em caldo RPMI (Figuras 9B, 9F). No entanto, biofilmes monoespécie de *C. albicans* mostraram crescimento abundante em BHI e RPMI (Figuras 9D, 9H).

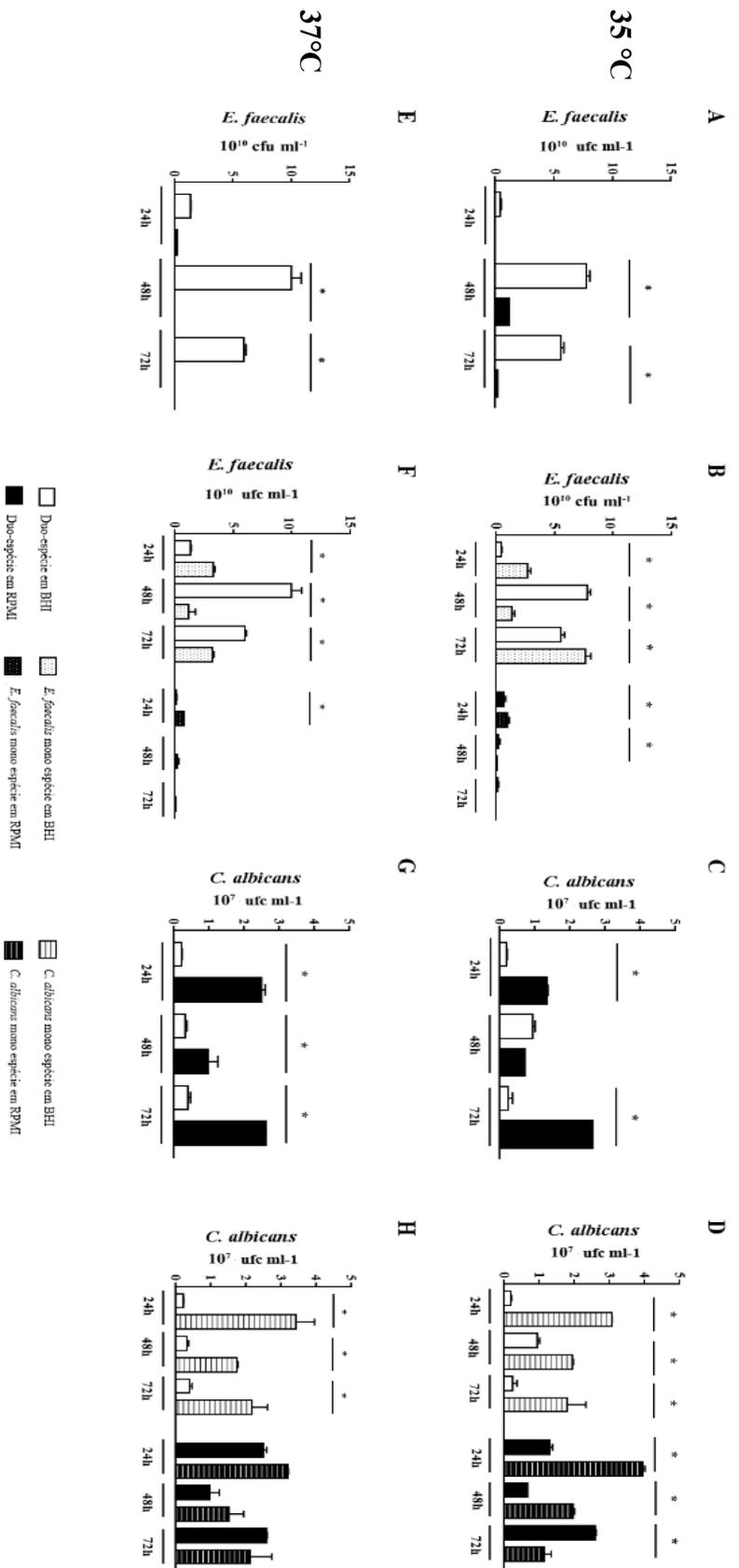
Majoritariamente, nenhuma relação de mutualismo foi detectada quando comparado ufc de biofilmes monoespécie e duo-espécie. Porém, o cultivo em caldo BHI após 48 h, em qualquer temperatura, resultou em maior contagem de unidades formadoras de *E. faecalis* em biofilmes duo-espécie do que em biofilmes monoespécie (Figuras 9B, 9F). Por outro lado, o crescimento de *C. albicans* em biofilmes duo-espécie levou a uma menor contagem ufc do que em biofilme monoespécie (Figuras 9D, 9H). Porém, biofilmes duo-espécie cultivados em caldo RPMI a 35 °C por 72 h, resultados em contagem de ufc de *C. albicans* maior do que em biofilmes monoespécie (Figura 9D), onde nenhum crescimento de *E. faecalis* foi detectado (Figura 9B).

O efeito da adesão microbiana e agitação na formação dos biofilmes foram

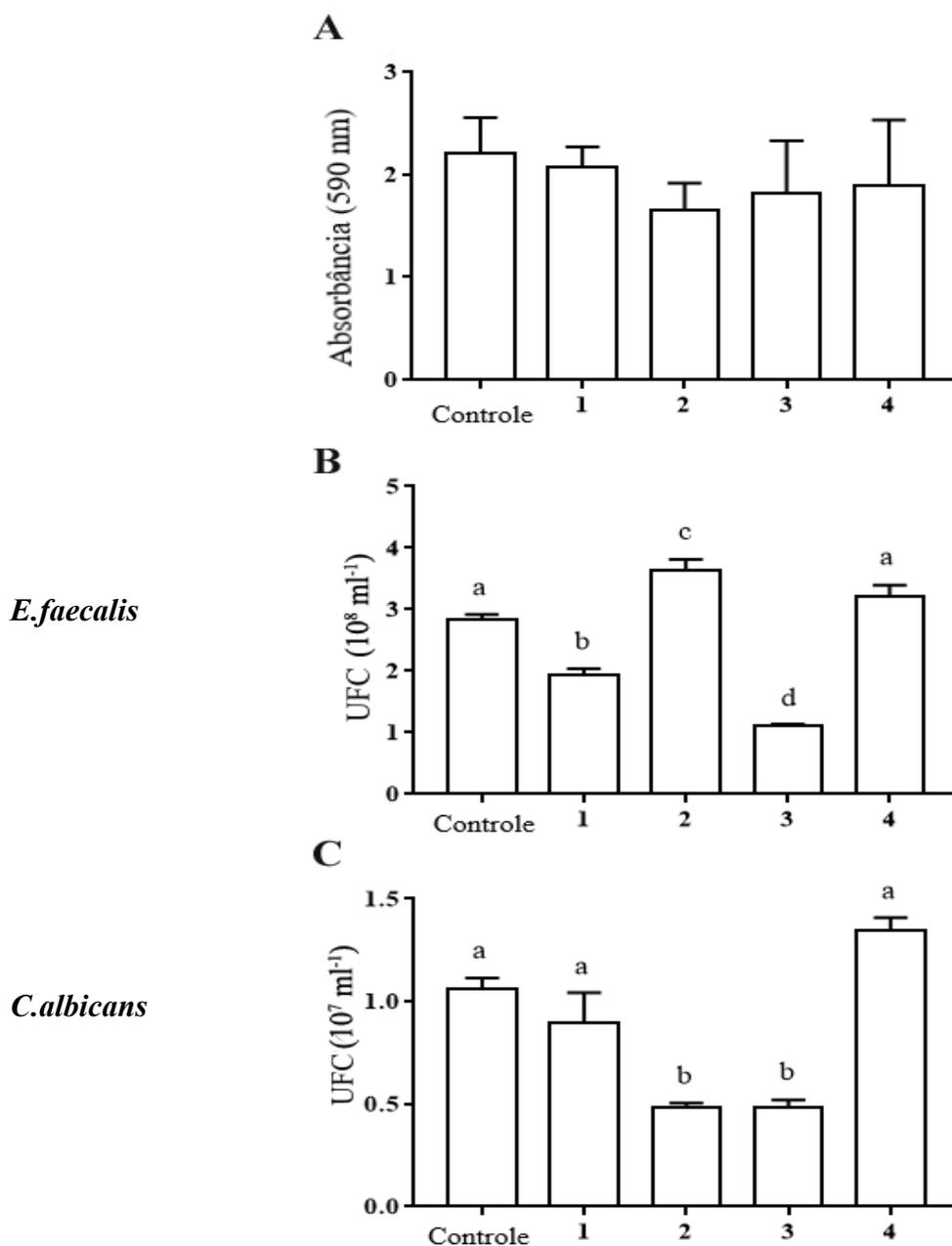
avaliadas em biofilmes duo-espécie formados em caldo BHI, a 35 °C por 48 h em atmosfera de microaerofilia, uma vez que essas condições permitiram maiores níveis de biomassa e ufc de *E. faecalis* e *C. albicans*, simultaneamente. A quantificação de biomassa foi similar entre os grupos testados (Figura 10A). A cerca de *E. faecalis*, uma maior contagem de ufc foi observada em biofilmes duo-espécie formados como descrito no protocolo 2, isto é, quando o inóculo de *C. albicans* era incubado por 3 h antes do acréscimo do inóculo de *E. faecalis* (Figura 10B). De uma forma geral, nenhum protocolo testado melhorou a contagem de ufc de *C. albicans*. Quando começando o inóculo de biofilmes duo-espécie, as maiores contagem de ufc de *C. albicans* foram obtidas após o acréscimo simultâneo com *E. faecalis*, como o executado nos protocolos 1 e 4 e no grupo controle (Figura 10C). Protocolos com o intervalo de 3 h antes da adição de suspensão fúngica ou bacteriana, realizada nos protocolos 2 e 3, reduziram a contagem de ufc de *C. albicans*. Nenhum benefício foi obtido em níveis de biomassa ou contagem de ufc dos biofilmes duo-espécie incubados sob agitação.



**Figura 8:** Biomassa do biofilme duo-espécie e dos biofilmes monoespécie crescidos em sobre diferentes condições: meio de cultura, temperatura e período de incubação. Os biofilmes duo-espécie foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos em meio BHI (barras brancas) ou RPMI (barras pretas) sob atmosfera de microaerofilia a 35 °C (A-C) ou 37 °C (D-F) e avaliados por 24 h, 48 h e 72 h. Os biofilmes monoespécie foram formados com *E. faecalis* (barras com pontilhadas) e *C. albicans* (barras estriadas) em meio BHI (barras brancas) ou meio RPMI (barras pretas) como descrito acima. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre biofilmes duo-espécie formados em BHI e RPMI. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre biofilmes monoespécie comparados com o respectivo biofilme duo-espécie. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de absorbância de cristal violeta.



**Figura 9:** Avaliação das unidades formadoras de colônia (ufc) dos biofilmes duo-espécie e mono-espécie. Os biofilmes duo-espécie foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos em meio BHI (barras brancas) ou RPMI (barras pretas) sob atmosfera de microaerofilia a 35 °C (A-D) ou 37 °C (E-F) e avaliados por 24 h, 48 h e 72 h. Os biofilmes mono-espécie foram formados com *E. faecalis* (barras com pontilhados) e *C. albicans* (barras estriadas) em meio BHI (barras brancas) ou meio RPMI (barras pretas) como descrito acima. Ensaios de ufc foram realizados em meio ágar Mitis salivarius para *E. faecalis* (A, B, E, F) e meio ágar Sabouraud complementado com cloranfenicol para *C. albicans* (C, D, G, H). (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre biofilmes duo-espécie formados em BHI e RPMI. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre biofilmes comparados com o respectivo biofilme duo-espécie. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de contagem de ufc.

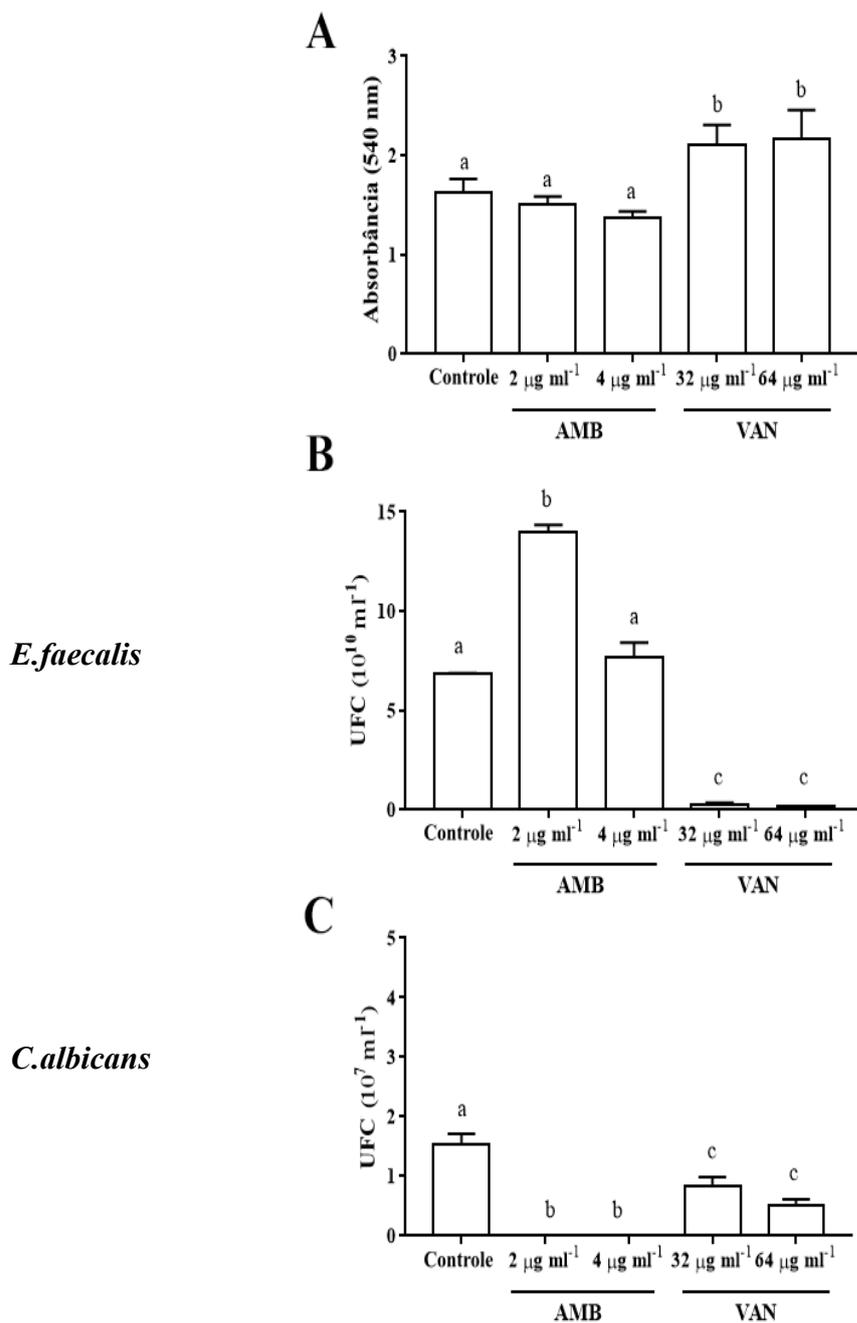


**Figura 10.** Biofilme duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* formados sob diferentes protocolos. Biofilmes foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 35 °C, por 48 h, e então avaliados em sua biomassa (A), e unidades formadoras de colônia (ufc) em ágar Mitis Salivarius (B) ou ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol (C). O eixo X são os diferentes protocolos utilizados para o crescimento do biofilme. O Protocolo 1 consiste na adição simultânea dos inóculos dos dois micro-organismos, seguida de incubação por 3 h para permitir a adesão das células, lavagem pós-adesão e incubação em meio BHI por mais 48 h. Em outros grupos experimentais, o inóculo de *C. albicans* foi adicionado primeiramente e após 3h de adesão, a suspensão de *E. faecalis* foi adicionada, sem lavagem pós-adesão (protocolo 2) ou com lavagem pós-adesão com PBS (Protocolo 3). O quarto grupo experimental (Protocolo 4) incluiu a adição de ambos os micro-organismos ao mesmo tempo sem lavagem pós-adesão, sob agitação. As letras acima das barras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de absorbância e contagem de ufc.

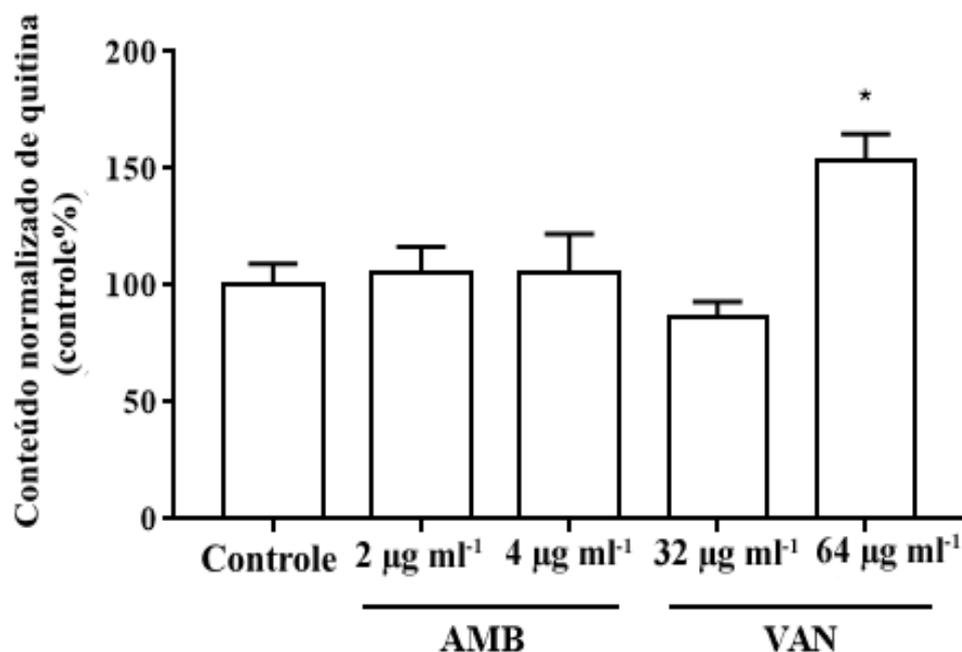
### 6.1.2 Resistência antimicrobiana e composição bioquímica do biofilme duo-espécie

A sensibilidade antimicrobiana dos biofilmes duo-espécie cultivados em caldo BHI em atmosfera de microaerofilia sem agitação por 48 h a 35 °C foi avaliada (Figura 11). AMB não induziu efeito sobre a biomassa do biofilme duo-espécie (Figura 11A), e permitiu um aumento na contagem de ufc de *E. faecalis* (Figura 11B). No entanto, AMB erradicou *C. albicans* dos biofilmes duo-espécie (Figura 11C). VAN induziu aumento na biomassa do biofilme duo-espécie (Figura 11A), no entanto inibiu o crescimento de *E. faecalis* (Figura 11B) e *C. albicans* (Figura 11C).

A composição bioquímica dos biofilmes duo-espécie foi investigada no que se refere a quantificação de carboidratos e proteínas. Biofilmes tratados com VAN a 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  mostraram aumento significativo na quantificação de quitina quando comparada com biofilmes controle (Figura 12). Nenhuma diferença estatística foi observada na quantificação de carboidratos por Safranina e Vermelho de Congo, assim como também a quantificação de proteínas entre os grupos controle e os grupos que receberam tratamento (Apêndice A).



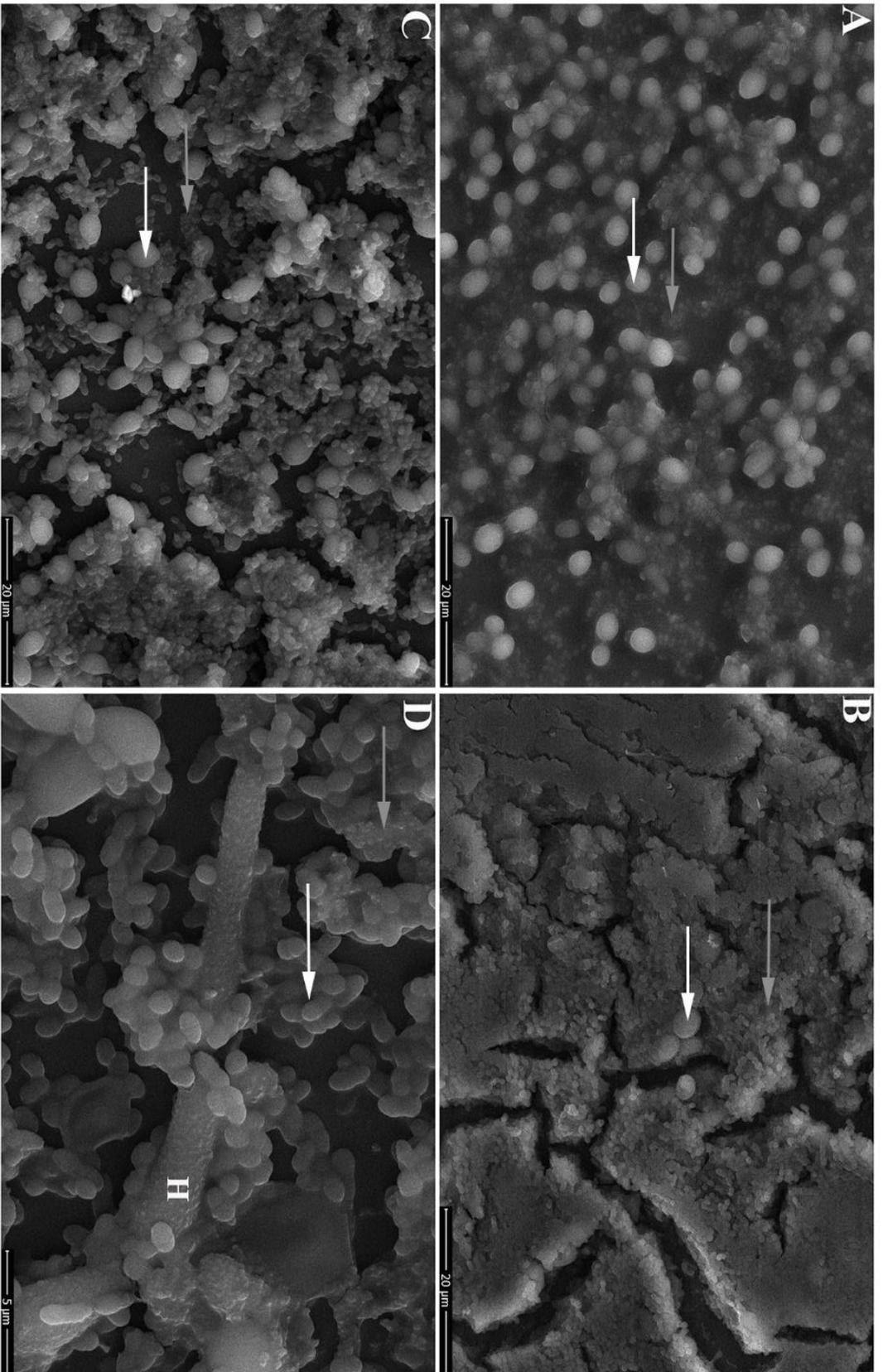
**Figura 11.** Avaliação da sensibilidade antimicrobiana do biofilme duo-espécie a anfotericina B (AMB) e vancomicina (VAN). Biofilmes foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 35 °C, por 48 h, sem agitação. Depois desse período, biofilmes foram tratados com AMB ou VAN e então avaliados em sua biomassa (A), e unidades formadoras de colônia (ufc) em ágar Mitis Salivarius (B) ou ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol (C). As letras acima das barras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de absorbância e contagem de ufc.



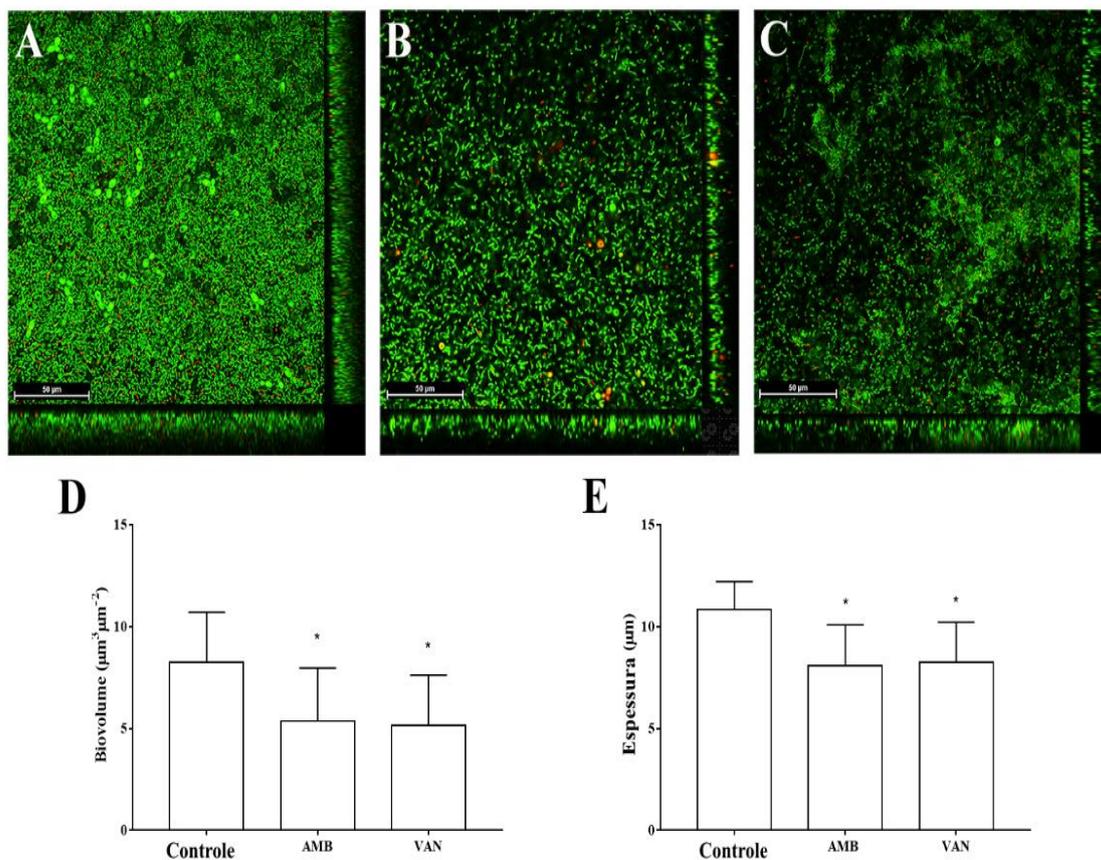
**Figura 12.** Conteúdo normalizado de quitina pelo controle do biofilme duo-espécie após tratamento com anfotericina B (AMB) e vancomicina (VAN). Biofilmes duo-espécie foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 35 °C, por 48 h, sem agitação. Depois desse período, biofilmes foram tratados com AMB ou VAN e então avaliados em seu conteúdo de quitina (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com o controle. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de conteúdo de quitina.

### 6.1.3 Morfologia ultraestrutural

A análise estrutural revelou que biofilmes duo-espécie foram formados com ambos os micro-organismos aderidos a um substrato, validando no protocolo proposto para formação do biofilme (Figura 13A, 14A). Foi observada prevalência de células viáveis sobre células mortas de cocos e leveduras nos grupos controle (Figura 14A). O tratamento com AMB permitiu uma proliferação de cocos e morte de leveduras (Figuras 13B, 14B). VAN permitiu a proliferação de leveduras, o aumento a matriz do biofilme e a primeira detecção de formação de hifas (Figuras 13C, 13D, 14C). Ambos AMB e VAN induziram estatisticamente significante redução no biovolume e espessura dos biofilmes quando comparadas com controle (Figuras 14D, 14E).



**Figura 13.** Imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Biofilmes duo-espécie foram formados em proporção 1:1 dos dois inoculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 35 °C, por 48 h, sem agitação. Depois desse período, biofilmes foram tratados com AMB (B) ou VAN (C). Imagens mostram enterococos (flechas cinzentas) e leveduras (flechas brancas). Uma hifa de *Candida albicans* (H) foi visualizada após tratamento com VAN (D). Magnificação: 5000x (A-C) e 15000 x (D); Barra: 20 µm (A-C) e 5 µm (D)



**Figura 14.** Imagens de microscopia confocal a laser de varredura (MCLV) dos biofilmes duo-espécie. Biofilmes foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 35 °C, por 48 h, sem agitação (A). Depois desse período, biofilmes foram tratados com AMB (B) ou VAN (C). Células viáveis estão coradas em verde, e as células mortas ou lesadas estão coradas em vermelho. Biovolume (D) e área de espessura (E) de cada biofilme foi quantificada. Magnificação: 600x. Barra: 50 µm. (\*) representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e grupo controle ( $p < 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de biovolume e espessura.

## 6.2 Parte II

### 6.2.1 Efeito das fenotiazinas contra células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans*

Os valores de CIM das soluções testadas frente a *E. faecalis* e *C. albicans* no presente estudo estão sumarizadas na Tabela 3. NaClO apresentou valores de CIM maiores para *E. faecalis* maior do que para *C. albicans* (quatro vezes maior). CHX apresentaram os mesmos valores de CIM para ambas as espécies ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). PMZ e CPZ apresentaram maiores valores de CIM para *C. albicans* (3, 2 e 5 vezes maiores, respectivamente) do que para *E. faecalis*. O sinergismo entre CHX e as fenotiazinas contra *E. faecalis* e *C. albicans* não foi detectado (ICFI=0,5-4,0). Porém, quando associado a PMZ ou CPZ, ocorreu uma redução do CIM de CHX entre 4 e 2 vezes. Além disso, os valores de CIM de PMZ e CPZ foram reduzidos de 8 a 128 vezes, respectivamente.

**Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionária**

Espécie	NaClO	CHX	PMZ	CPZ	PMZ + CHX		CPZ + CHX	
					CIM	FICI	CIM	ICFI
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2500	4	64	32	8 + 1	0,562	0,25 + 1	0.507
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	625	4	128	50	8 + 2	0,531	12,5 + 2	1

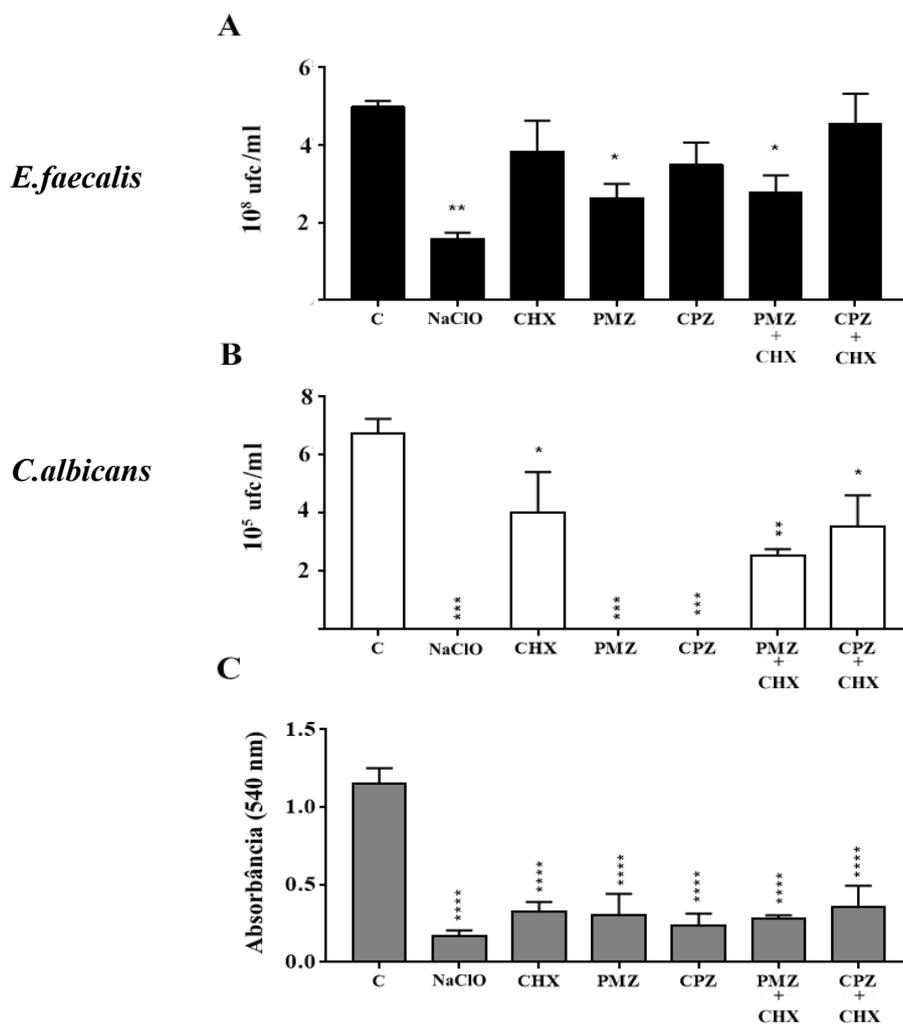
NaClO: hipoclorito de sódio, CHX: clorexidina; PMZ: prometazina; CPZ: clorpromazina. ICFI: Índice de Concentração Inibitória Fracionária.

### 6.2.2 Efeito das fenotiazinas contra o biofilme duo-espécie

#### 6.2.2.1 Ensaios de Contagem de Unidades Formadoras de colônia e Cristal Violeta

Quando comparado com o grupo controle, NaClO reduziu de forma significativa a contagem de ufc de *E. faecalis*, e também erradicou *C. albicans*, sendo a solução testada mais efetiva. CHX reduziu significativamente a contagem de ufc de *C. albicans*, mas não apresentou efeito na contagem de ufc de *E. faecalis*. PMZ reduziu significativamente a contagem de ufc de *E. faecalis* e erradicou *C. albicans*. CPZ erradicou *C. albicans*, mas não apresentou efeito na contagem de ufc de *E. faecalis*. PMZ+CHX reduziu o ufc de

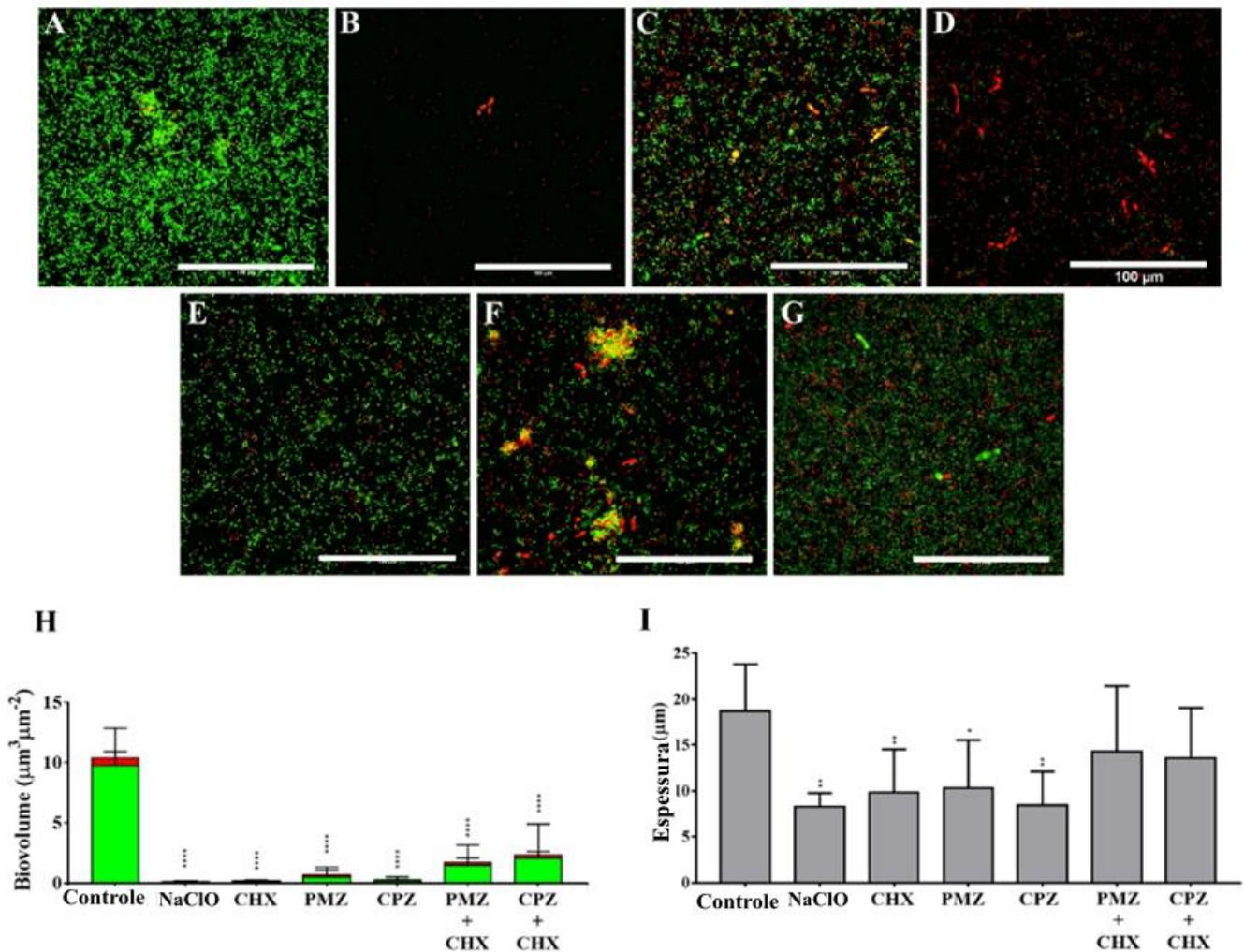
ambos os micro-organismos, enquanto CPZ+CHX só foi contra *C. albicans* (Figuras 15A, 15B). Todas as soluções testadas reduziram significativamente a biomassa do biofilme duo-especie quando comparados com o controle.



**Figura 15.** Contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de *E. faecalis* (A), *C. albicans* (B) e biomassa (C) do biofilme duo-especie. Biofilmes duo-especie maduros foram tratados por 10 minutos com PBS como controle (c) ou com soluções teste, como descrito a seguir: NaClO (25 mg ml<sup>-1</sup>); CHX (20 mg ml<sup>-1</sup>); PMZ (1,28 mg ml<sup>-1</sup>); CPZ (0,5 mg ml<sup>-1</sup>); PMZ+CHX (0,08 mg ml<sup>-1</sup> + 0,02 mg ml<sup>-1</sup>); CPZ (0,5 mg ml<sup>-1</sup>) CPZ+CHX (0,125 mg ml<sup>-1</sup> + 0,02 mg ml<sup>-1</sup>). UFC foi realizada em ágar Mitis Salivarius ou ágar sabouraud suplementado com cloranfenicol para *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. Asterisco acima das barras representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle: (\*) representa p<0,05, (\*\*) representa p<0,01, (\*\*\*) p <0,005 e (\*\*\*\*) representa p<0.001. Dados expressos em média ± desvio padrão de absorbância e ufc.

#### *6.2.2.2 Microscopia Confocal a Laser de Varredura*

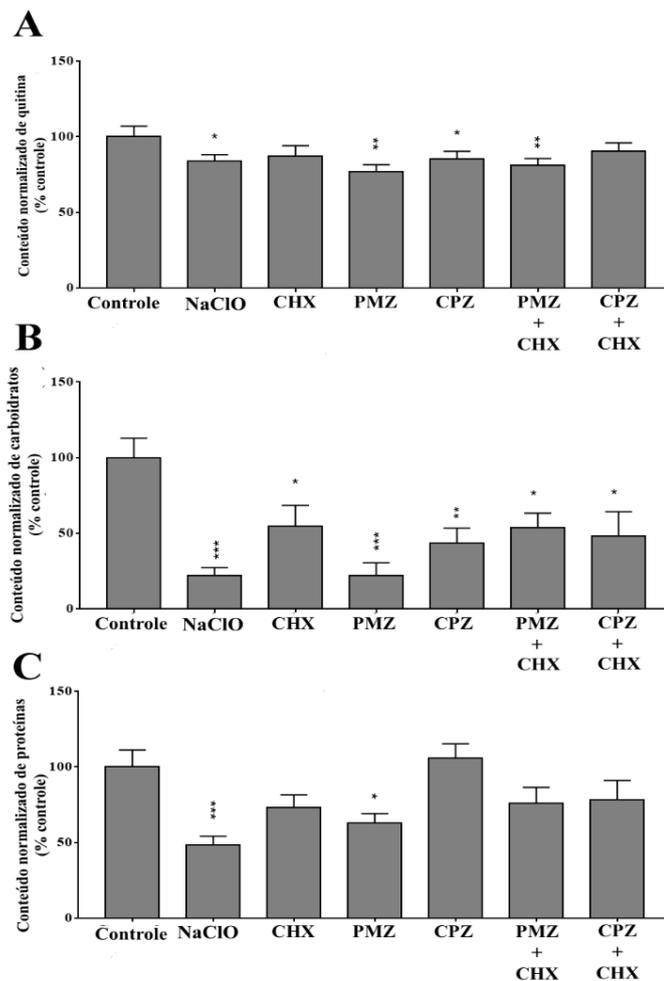
O grupo controle apresentou formação de biofilme denso, com predominância de células viáveis, consistindo em cocos e leveduras (Figura 16A). Depois do tratamento com NaClO, houve redução na densidade dos biofilmes e apenas células não-viáveis foram detectadas (Figura 16B). O tratamento com CHX resultou em algumas leveduras e cocos não-viáveis, mas não tão significativa como após o tratamento com NaClO (Figura 16C). O tratamento com PMZ e CPZ resultou tanto em morte de cocos como de leveduras (Figuras 16D, 16F), enquanto sua associação com CHX reduziu seu efeito antibiofilme (Figuras 16G, 16H). Todas as soluções testadas reduziram significativamente o biovolume dos biofilmes duo-espécie (Figura 16H). A espessura dos biofilmes foi significativamente reduzida após tratamento com NaClO, CHX, PMZ e CPZ, mas não por PMZ+CHX e CPZ+CHX (Figura 16I).



**Figura 16.** Imagens de Microscopia confocal a laser de varredura (MCLV) do biofilme duo-espécies biofilme após o tratamento por 10 minutos com Salina (A); 25 mg ml<sup>-1</sup> NaClO (B); 20 mg ml<sup>-1</sup> CHX (C); 1,28 mg ml<sup>-1</sup> PMZ (D); PMZ+ CHX, 0,08 mg ml<sup>-1</sup> + 0,02 mg ml<sup>-1</sup> (E); 0,5 mg ml<sup>-1</sup> CPZ (F); CPZ + CHX, 0,125 mg ml<sup>-1</sup> + 0,02 mg ml<sup>-1</sup> (G). Magnificação 60x, barra 100  $\mu\text{m}$ . Células viáveis estão coradas em verde, e as células mortas ou lesadas estão coradas em vermelho. Biovolume (H) e área de espessura (I) de cada biofilme foi quantificada. Magnificação: 600x. Barra: 50  $\mu\text{m}$ . Asterisco acima das barras representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle: (\*) representa  $p < 0,05$  (\*\*) representa  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 6.2.2.3 Composição bioquímica

O conteúdo de quitina, proteínas e carboidratos dos biofilmes duo-espécie estão ilustrados na Figura 17. Todos as soluções testadas, exceto CHX e CPZ+CHX, significativamente reduziram o conteúdo de quitina dos biofilmes, sendo a maior redução induzida pelo tratamento com PMZ e PMZ+CHX (Figura 17A). Todas as substâncias testadas reduziram significativamente o conteúdo geral de carboidratos, com a maior redução encontrada após o tratamento com NaClO e PMZ (Figura 17B). O conteúdo de proteínas foi significativamente reduzido somente após o tratamento com NaClO e PMZ, sendo a redução mais significativa induzida pelo primeiro (Figura 17C).



**Figura 17.** Conteúdo normalizado de Quitina (A), carboidratos (B) e proteínas (C) dos biofilmes duo-espécie após tratamento de 10 minutos com solução salina (Controle), 25 mg ml<sup>-1</sup> NaClO; 20 mg ml<sup>-1</sup> CHX; 1,28 mg ml<sup>-1</sup> PMZ; PMZ+ CHX, 0,08 mg ml<sup>-1</sup> + 0,02 mg ml<sup>-1</sup>; 0,5 mg ml<sup>-1</sup> CPZ; CPZ + CHX, 0,125 mg ml<sup>-1</sup> + 0,02 mg ml<sup>-1</sup>. Asterisco acima das barras representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle:

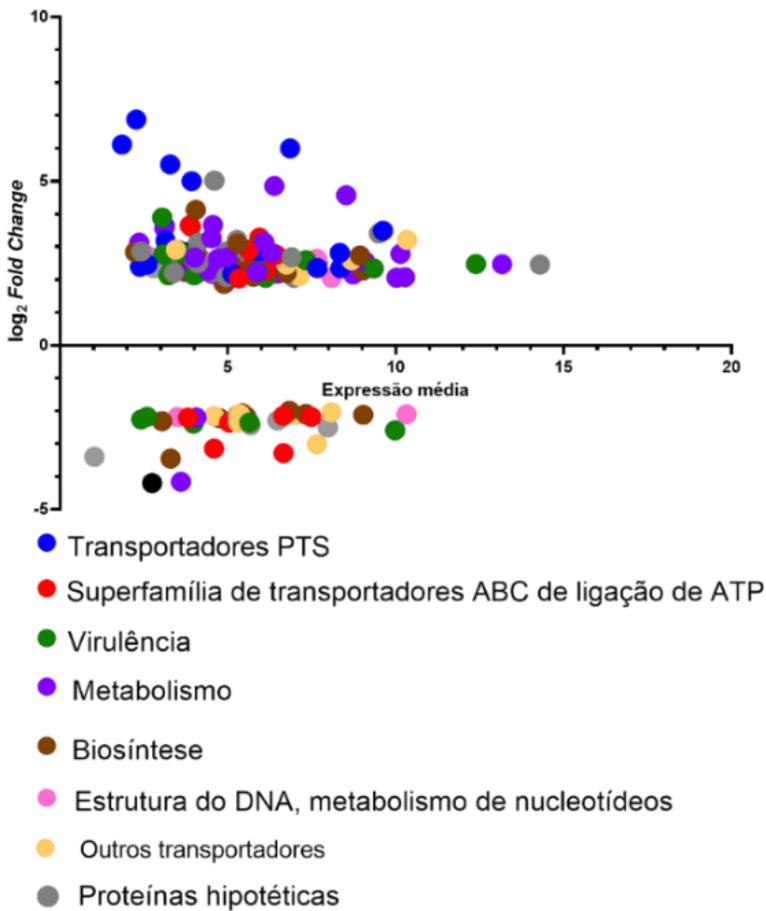
(\*) representa  $p < 0,05$  (\*\*) representa  $p < 0,01$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 6.3 Parte Experimental III

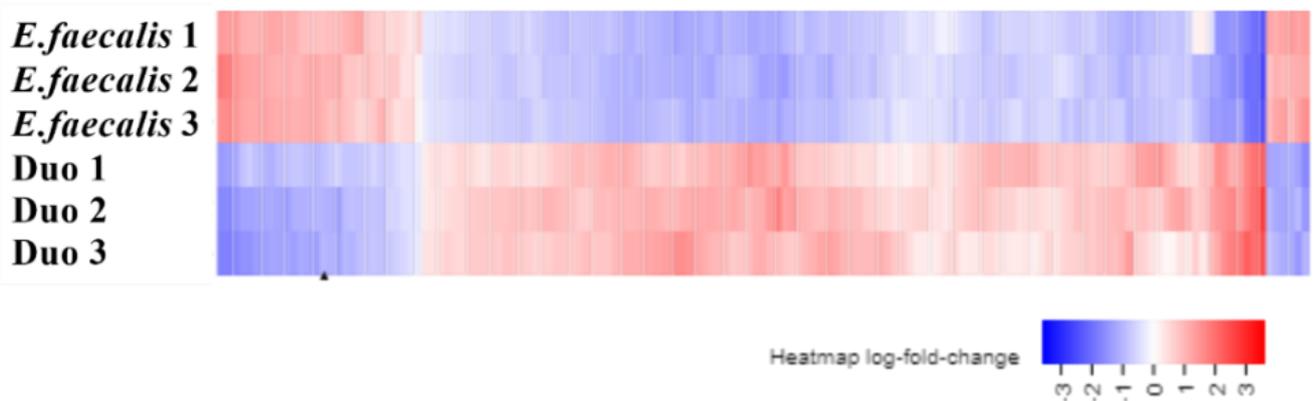
### 6.3.1 RNAseq

As análises de transcriptoma revelaram que *E. faecalis* em biofilme duo-espécie apresentaram um total de 149 genes com expressão significativamente diferente quando comparado com transcriptoma de *E. faecalis* em biofilme monoespécie (FDR=0.05, logFC=2). Esses genes diferentemente expressos puderam ser caracterizados de acordo com sua função, nas seguintes categorias: transportadores da família do sistema fosfoenolpiruvato (PTS), superfamília de transportadores ABC de ligação de ATP, virulência, metabolismo, biossíntese, componentes de DNA e metabolismo de nucleotídeos, outros transportadores e proteínas hipotéticas (Figura 18A). O *heat-map* ilustra o *log-fold* change de expressão gênica *E. faecalis* em biofilme duo-espécie comparado com biofilme monoespécie (figura 18B). Dentre os genes com aumento de expressão gênica, destaca-se os genes relacionados aos transportadores PTS (sistema transportador fosfoenolpiruvato) listados na Tabela 4, em especial o óperon OG1RF\_10018, OG1RF\_10019, OG1RF\_10020 e OG1RF\_10021 transportadores PTS.

A



B



**Figura 18.** Análise de RNAseq de genes diferentemente expressos por *E. faecalis* OG1RF *wild-type* em biofilme duo-espécie em relação ao biofilme monoespécie formados por 48h. (A) O Gráfico MA fornece uma visão geral da expressão diferencial *versus* os níveis médios normalizados de expressão de genes. (B) *Heat-map* dos genes diferentes expressos identificados pela *log-fold change*. *Cutoffs* : *FDR*=0.05 e *log<sub>2</sub>FC*=2 para cada replicata experimental.

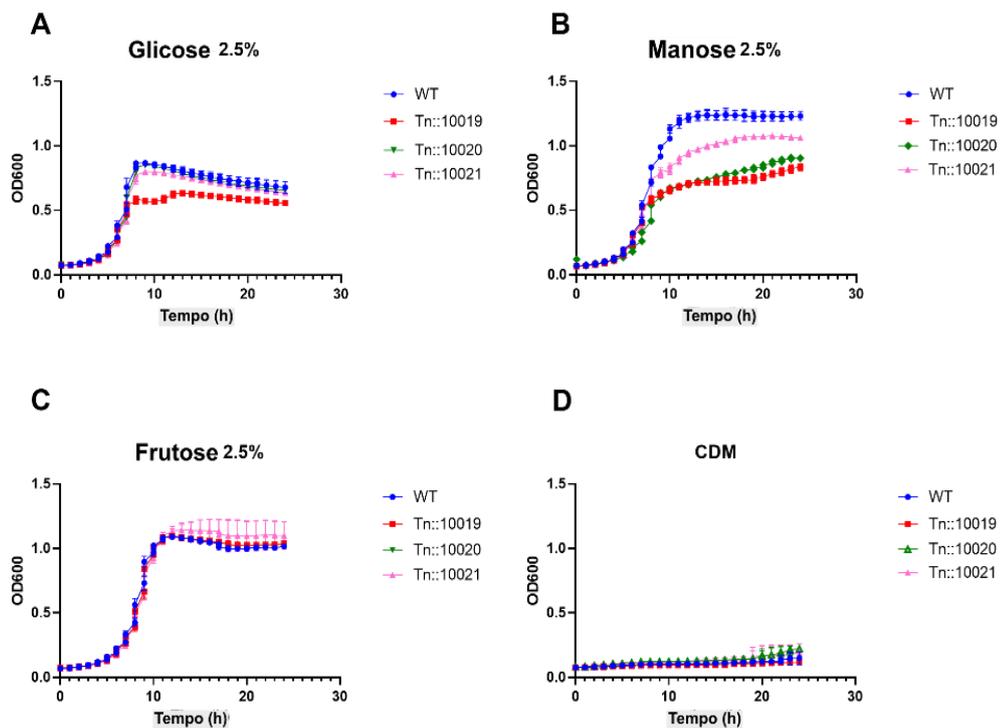
Tabela 4. Listas de genes relacionados com transportadores PTS que apresentaram expressão aumentada em *E. faecalis* OG1RF *wild-type* em biofilme duo-espécie em relação ao biofilme monoespécie.

Lócus	Gene	Descrição	Valor P	Log <sub>2</sub> FC	Linear FC	FDR
OG1RF_10018	manX	Família de transportador PTS componente IIB manose/frutose/sorbose	2.01E-08	2,3554296	5.11746596	3,09E-07
OG1RF_10019	manX2	Família de transportador PTS componente IIAB manose	1.58E-11	3,49223314	11.2529639	1,32E-08
OG1RF_10020	manY	Família de transportador PTS componente IIC manose/frutose/sorbose	1.16E-10	2,81298565	7.02737383	2,02E-08
OG1RF_10021		Família de transportador PTS componente IID manose/frutose/sorbose	1.01E-10	3,2082623	9.24236651	2,12E-08
OG1RF_10456	lacR	Repressor de Família de transportador PTS lactose	8.34E-08	2,17261695	4.50840447	5,47E-07
OG1RF_10745	celA2	Família de transportador PTS, enzima I	2.31E-10	6,87675891	117.519709	2,02E-08
OG1RF_10746		Família de transportador PTS componente IIC lactose/celobiose	2.32E-06	2,46229838	5.51093983	1,81E-05
OG1RF_10750	celA3	Família de transportador PTS, enzima I	2.35E-09	6,1178346	69.4467177	3,24E-08
OG1RF_10751	lacF	Família de transportador PTS componente IIA	4.65E-10	5,51165013	45.6217579	3,29E-08
OG1RF_10752		Família de transportador PTS componente IIC lactose/cellobiose (lac)	1.45E-12	5,99729863	63.8802754	1,42E-09
OG1RF_11147		Glicerona quinase Família de transportador PTS componente IIA	8.34E-09	2,58942948	6.01860644	1,47E-07
OG1RF_11551		fosfotransferase de sistema PTS, manose-componente IIB	6.76E-08	3,19098877	9.13236657	2,34E-07
OG1RF_11552		Família de transportador PTS, componente IIA manose/frutose	2.58E-07	2,38891538	5.23763446	1,52E-06
OG1RF_11981		Família de transportador PTS, componente IIA glucitol/sorbitol	6.01E-08	2,35001565	5.0982978	5,20E-07
OG1RF_12476		Família de transportador PTS, componente IIA, frutose/manitol (fru)	2.81E-08	3,62327377	12.322933	2,48E-07
OG1RF_12477		Família de transportador PTS, componente IIB, ascorbato	2.25E-09	4,9977056	31.9491491	3,90E-08
OG1RF_12478		Família de transportador PTS, componente IIC, frutose/manitol	6.08E-08	3,03718683	8.20888814	3,00E-07
OG1RF_12479		Família de transportador PTS componente II	7.63E-07	2,51542753	5.71767068	1,69E-06

Log<sub>2</sub>FC (Log-fold change); FDR= False Discovery rate; Linear FC (Linear-fold change)

### 6.3.2 Ensaios de monitoramento de crescimento com restrição de carboidratos

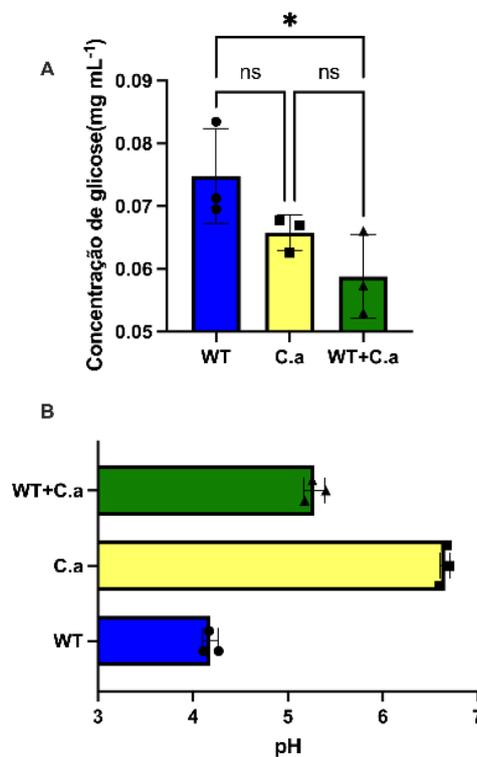
A influência dos genes relacionados com a família de transportadores PTS no consumo de glicose, manose e frutose foi investigada (Figura 19). Quando comparadas com a curva de crescimento de cepa *wild-type*, a cepa mutante OG1RF Tn::10019 apresentou redução em sua curva de crescimento quando cultivadas em meio CDM+ 2,5 % glicose (Figura 19A) e CDM+2,5 % manose (Fig. 19B), enquanto as cepas OG1RF Tn::10020 e OG1RF Tn::10021 apresentaram redução de crescimento apenas quando cultivadas em meio CDM+2,5 % manose (Fig. 19B). Quando cultivadas em meio CDM+ 2,5% frutose, a cepa *wild-type* e as duas cepas mutantes apresentaram curva de crescimento semelhante (Fig. 19C). A ausência de uma fonte de carboidrato no meio CDM restringiu o crescimento de todas as cepas testadas (Fig. 19D).



**Figura 19.** Curvas de crescimento das cepas *wild type* (WT), Tn::10019, Tn::10020 e Tn::10021 de *E. faecalis* OG1RF crescidas em meio CDM contendo como única fonte de carboidrato glicose (A), manose (B) ou frutose (C) incubadas em Bioscreen C a 37°C por 18h. Para fins de controle experimental, o crescimento em CDM sem fonte de carboidrato também foi investigado (D). Pontos representam as médias de 3 replicatas experimentais. Barras de desvio representam o desvio padrão das médias. Valores expressos em absorbância (OD=600 nm).

### 6.3.3 Quantificação de glicose e mensuração de pH dos biofilmes

O sobrenadante dos biofilmes duo-espécie apresentou significativamente menor concentração de glicose do que os dos biofilmes monoespécie de *E. faecalis* e *C. albicans* ( $p < 0.05$ ) (Figura 20A). O sobrenadante dos biofilmes monoespécie de *E. faecalis* apresentaram pH mais ácido, enquanto os dos biofilmes monoespécie de *C. albicans* apresentaram pH mais alto. Os valores de pH do sobrenadante dos biofilmes duo-espécie foram intermediários em relação aos biofilmes monoespécie (Figura 20B).

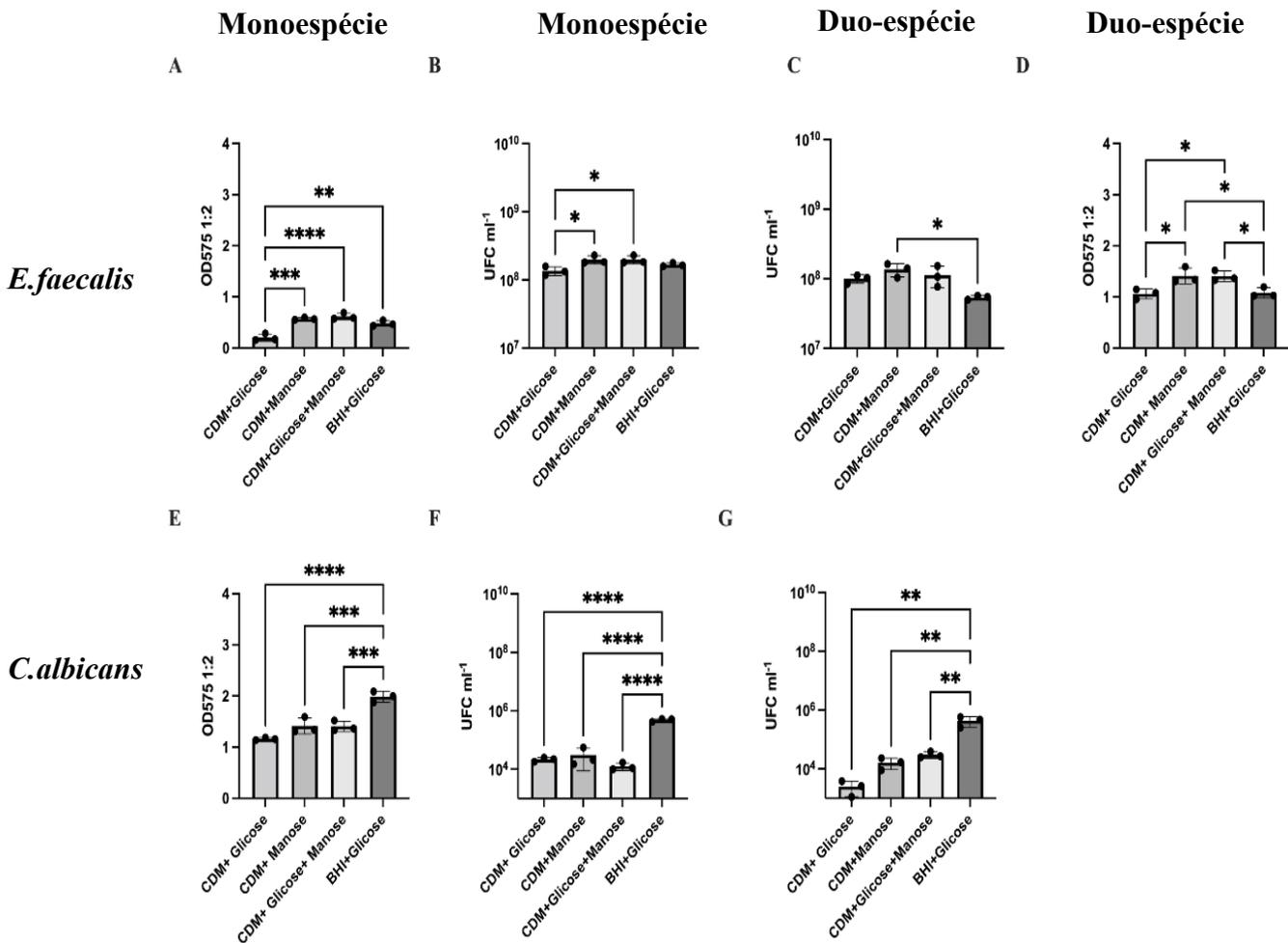


**Figura 20.** Concentração de glicose (A) e valores de pH (B) dos sobrenadantes dos biofilmes monoespécie e duo-espécie. Os biofilmes monoespécie foram formados com *E. faecalis* OG1RF *wild-type* (WT) e *C. albicans* SC5134 (C.a) em meio BHI + 20 mM glicose, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 35 °C por 48 h. Os biofilmes duo-espécie (WT+C.a) foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos em meio BHI + 20 mM glicose em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 35 °C por 48 h. (\*) representa  $p < 0,05$ . Valores de concentração de glicose expresso em mg mL<sup>-1</sup> após normalização com curva de glicose *versus* absorbância.

### 6.3.4 Influência de glicose e manose na formação dos biofilmes

Biofilmes monoespécie de *E. faecalis* OG1RF *wild-type* cultivados em CDM+ 20mM manose, CDM + 10 mM glicose + 10 mM manose e BHI + 20 mM glicose apresentaram maior biomassa e maior número de ufc que quando cultivados em CDM + 20 mM glicose (Figuras 21A, 21B) ( $p < 0.05$ ). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa na biomassa e contagem de ufc do biofilme monoespécie cultivado em BHI + 20 mM e os mesmos cultivados

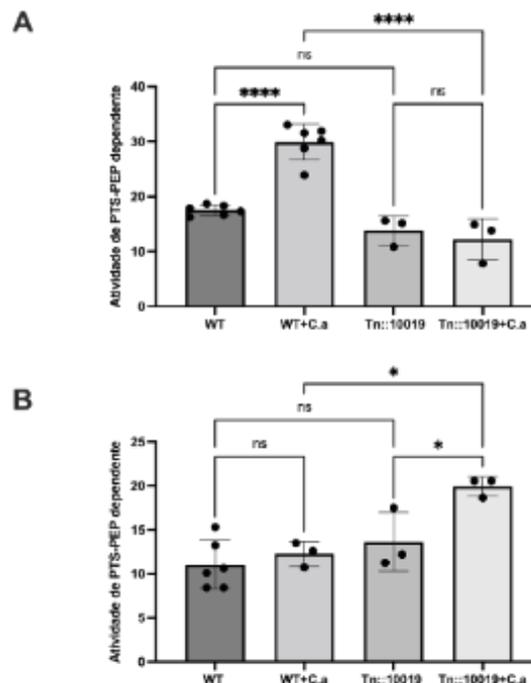
em CDM + 20 mM manose e CDM + 10mM glicose + 10mM manose. Por outro lado, biofilmes monoespécie de *C. albicans* apresentaram maiores biomassa e valores de ufc em BHI + glicose ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa na contagem de ufc entre os grupos cultivados em meio CDM (Figuras 21E, 21F). Nos biofilmes duo-espécie, as contagens de ufc de *E. faecalis* foram estatisticamente maiores quando cultivados em meio CDM + 20 mM manose do que em meio BHI + 20 mM glicose (Figura 21C), enquanto as contagens de ufc de *C. albicans* em BHI + 20 mM foram estatisticamente maiores do que todos os outros grupos (Figura 21F). Os biofilmes duo-espécie apresentaram maior biomassa quando cultivados em meio CDM + 20 mM manose e meio CDM + 10mM glicose + 10 mM manose (Figura 21D).



**Figura 21.** Contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de *E. faecalis* (B, C) *C. albicans* (F,G) e biomassa (A,D,E) dos biofilmes monoespécie e duo-espécie. Os biofilmes mono-espécie foram formados com *E. faecalis* OG1RF *wild-type* (A, B) e *C. albicans* SC5134 (E, F) em meio BHI + 20 mM glicose, CDM + 20 mM glicose, CDM + 20 mM manose, CDM + 10 mM glicose + 10 mM manose sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 35°C por 48h. Os biofilmes duo-espécie (C, D, G) foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos em meio BHI + 20 mM glicose, CDM + 20 mM glicose, CDM + 20 mM manose, CDM + 10 mM glicose + 10 mM manose em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 35 °C por 48 h. Ensaios de ufc foram realizados em meio ágar Mitis salivarius para *E. faecalis* (B, C, D) e meio ágar Sabouraud complementado com cloranfenicol para *C. albicans* (F, G). (\*) representa  $p < 0,05$ ; (\*\*) representa  $p < 0,01$ ; (\*\*\*) representa  $p < 0,005$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de absorbância e ufc.

### 6.3.5 Influência de *C. albicans* na atividade dos transportadores PTS de *E. faecalis*

Utilizando cepa *E. faecalis* OG1RF *wild-type*, a atividade de transportadores PTS para manose foi significativamente maior em biofilmes duo-espécie do que em biofilmes monoespécie ( $p < 0,05$ ). Já utilizando a cepa mutante OG1RF Tn::10019, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na atividade de PTS para transporte manose em biofilmes mono e duo-espécie. Em biofilme monoespécie, *E. faecalis* OG1RF *wild-type* e *E. faecalis* OG1RF Tn::10019 apresentaram atividade de PTS para transporte de manose semelhante, enquanto em biofilme duo-espécie, *E. faecalis* OG1RF *wild-type* apresentou maior atividade ( $p < 0,05$ ) (Fig. 22A). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a atividade de transportadores PTS para frutose de *E. faecalis* OG1RF *wild-type* em biofilmes monoespécie e duo espécie. Já a atividade dos transportadores PTS para frutose de *E. faecalis* OG1RF Tn::10019 foi estatisticamente maior em biofilme duo-espécie do que em biofilme duo-espécie (Fig. 22B). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a atividade de transportadores PTS para glicose entre todos os grupos.

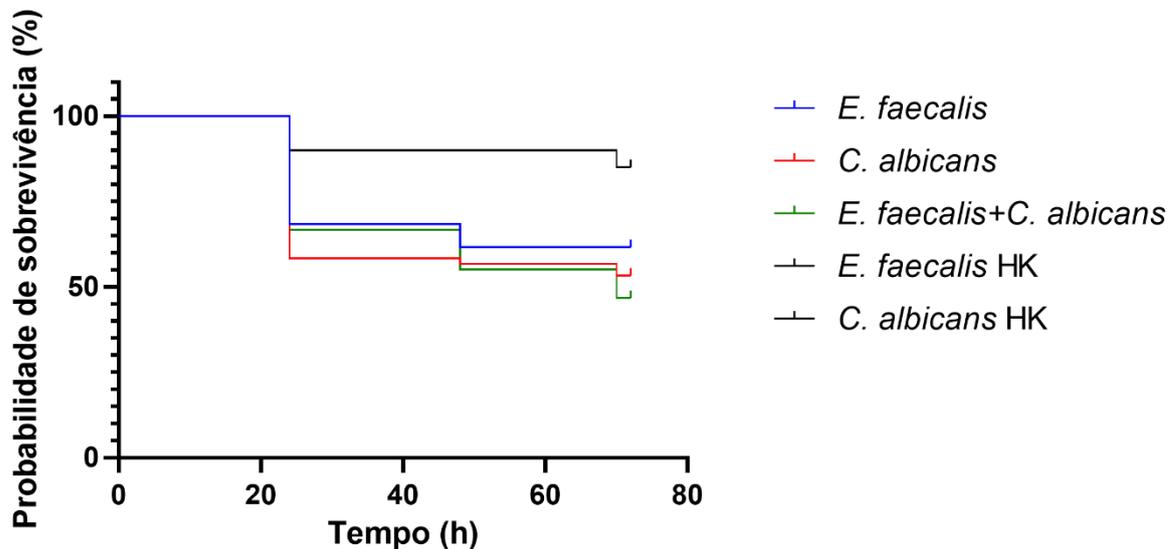


**Figura 22.** Atividade de transportadores PTS dependente de fosfoenolpiruvato para Manose (A) e Frutose (B) de biofilmes monoespécie e duo-espécie. Os biofilmes monoespécie foram formados com *E. faecalis* OG1RF *Wild-type* (WT), OG1RF Tn::10019 (Tn::10019) e *C. albicans* SC5134 (C.a) em meio BHI + 20 mM glicose em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 35 °C por 48 h. Os biofilmes duo-espécie (WT+C.a, Tn::10019+C.a) foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos em meio BHI + 20 mM glicose em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 35°C por 48 h. (ns) representa  $p > 0,05$ ; (\*) representa  $p < 0,05$ ; (\*\*) representa  $p < 0,01$ ; (\*\*\*) representa  $p < 0,005$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ . Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da taxa de oxidação de NADH dependente de PEP normalizada para

a concentração proteica determinada pelo ensaio de BCA. A oxidação de NADH dependente de PEP de biofilmes monoespécie de *C. albicans* foi calculada e subtraída da atividade dos transportadores PTS no biofilme duoespécie.

### 6.3.6 Ensaio de infecção *in vivo* em invertebrado *Galleria mellonella*

A probabilidade de sobrevivência das larvas sob mono infecção de *E. faecalis* e *C. albicans* após 72 h foi 60 % e 55 % respectivamente. Já em coinfeção, a probabilidade de sobrevivência reduziu para 46,6 %. Os grupos *E. faecalis* mortos por ebulição e *C. albicans* mortos por ebulição (HK) apresentaram probabilidade de sobrevivência de 85 % (Figura 23). As larvas foram consideradas mortas após constatação de ausência de resposta a estímulo externo e extensa melanização (LI et al., 2013).



**Figura 23.** Ensaio de Infecção em *G. mellonella*. Probabilidade de sobrevivência das larvas após infecção com *E. faecalis* OG1RF wild-type, *C. albicans* SC5134 wild-type, *E. faecalis* OG1RF wild-type + *C. albicans* SC5134 wild-type. (\*\* $p < 0,01$ , log rank test)

## 7 DISCUSSÃO

Periodontites periapicais persistentes pós-tratamento são doenças associadas com canais radiculares tratados, sendo primariamente causadas por infecções do sistema de canais radiculares que resistiram ao tratamento endodôntico (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2022). De forma geral, o fracasso do tratamento está relacionado com fatores do hospedeiro, como complexidades anatômicas do canal radicular, e fatores microbianos (DELBONI et al., 2017). Biofilmes microbianos são comumente encontrados aderidos nas paredes dos canais radiculares, e algumas espécies são capazes de colonizar o interior dos túbulos dentinários em diferentes profundidades, limitando a eficácia da desinfecção pela preparação mecânica endodôntica convencional (WONG et al., 2021). Portanto, abordagens avançadas são necessárias para erradicar esses biofilmes de forma eficaz.

Pesquisas cultura-dependente e cultura-independente encontraram uma diversidade microbiana menor em canais radiculares submetidos ao tratamento endodôntico quando comparados com infecções primárias. *E. faecalis* foi detectado regularmente em diversos estudos em periodontites periapicais persistentes, porém infecções polimicrobianas também foram (GOMES et al., 2021; MACHADO et al., 2020). Nesse cenário, muitos estudos demonstraram o papel de *C. albicans* como um importante agente em doenças orais, tendendo a influenciar a fisiopatologia de infecções periapicais (PERSON; ÖZOK, 2017; YOO et al., 2020). Ambos *E. faecalis* e *C. albicans* são capazes de resistir a condições ambientais desfavoráveis após o tratamento endodôntico, sendo capazes de colonizar os túbulos dentinários (YOO et al., 2020).

Os resultados sugerem que *E. faecalis* e *C. albicans* exercem um efeito negativo na virulência um do outro, como observado na dinâmica dos ensaios de contagem de UFC em biofilmes duo-espécie. Estudos anteriores têm mostrado resultados contraditórios no que se refere a interação de *E. faecalis* e *C. albicans*. Usando modelo nematódeo, Cruz et al. (2013) demonstraram que *E. faecalis* é capaz de reduzir a virulência de *C. albicans* através da inibição da morfogênese de hifas. No entanto, Swidergall et al. (2013) descreveram uma proteína de membrana de *C. albicans* capaz de inibir a ligação de antibióticos e peptídeos de defesa do hospedeiro, podendo possivelmente proteger *E. faecalis*, levando a infecções duradouras.

Estudos experimentais demonstraram que *E. faecalis* é mais resistente a condições ambientais desfavoráveis quando em coexistência com *C. albicans*, formando um biofilme mais espesso e denso em canais radiculares na presença das leveduras (GAO et al., 2016). Ensaios realizados em modelo organo-típico de mucosa oral mostraram que genes associados a

virulência de *C. albicans*, como adesão, morfogênese e formação de biofilme, tiveram sua expressão aumentada na presença de *E. faecalis*, enquanto genes bacterianos relacionados com *quorum sensing*, formação de biofilme, virulência e invasão celular tiveram expressão reduzida (KRISHNAMOORTHY et al., 2020). Recentemente, estudos *in vivo* demonstraram que *E. faecalis* em coexistência com *C. albicans* em periodontites periapicais persistentes em ratos aumentou a produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ , quando comparado com mono infecções (DU et al., 2021). Porém, utilizando uma abordagem de RNA-seq, autores encontraram uma expressão de genes de virulência de *C. albicans* na presença de *E. faecalis* simultaneamente aumentadas e reduzidas (ALSHANTA et al., 2022) A grande variedade de condições experimentais desses estudos posteriores pode ser responsável por essa inconsistência na literatura. De forma geral, no presente estudo, os biofilmes duo-espécie apresentaram menor biomassa quando comparadas com biofilmes monoespécie, o que sugere ausência de mutualismo ou comensalismo. A biomassa remanescente detectada após tratamento com VAN e AMB sugere dificuldade na erradicação do biofilme duo-espécie em contexto clínico.

Para o cultivo de biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, diferentes protocolos experimentais já foram descritos. Embora os meios BHI (DU et al., 2021; JACOB et al., 2020; MADLA-CRUZ et al., 2020; SANGALLI et al., 2018) e RPMI (ALSHANTA et al., 2022; DIOGO et al., 2017) têm sido os mais frequentemente utilizados para formação dos biofilmes, o presente estudo detectou um reduzido crescimento de *E. faecalis* quando os biofilmes duo-espécie foram cultivados em RPMI. Tanto *E. faecalis* como *C. albicans* cresceram satisfatoriamente em BHI, em acordo com Sangalli et al. (2018), Jacob et al. (2020) e Du et al. (2021). Estudos anteriores com biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans* os cultivaram a 37 °C (DIOGO et al., 2017; DU et al., 2021; JACOB et al., 2020; SANGALLI et al., 2018). No entanto, no presente estudo, o cultivo dos biofilmes foi otimizado a 35 °C, especialmente no que se refere a contagem de ufc de *C. albicans*.

Biofilmes de *E. faecalis* e *C. albicans* têm sido estudados utilizando diferentes inóculos iniciais. Autores têm escolhido trabalhar com as duas suspensões microbianas em proporção 1:1 em mesma concentração (DIOGO et al., 2017; FU et al., 2021) ou diferentes concentrações (ALSHANTA et al., 2022; DU et al., 2021; JACOB et al., 2020). Os biofilmes duo-espécie também têm sido cultivados utilizando a inoculação microbiana em duas etapas, inoculando primeiro *C. albicans* no oitavo dia após a inoculação de *E. faecalis* (SANGALLI et al., 2018). Uma vez que *E. faecalis* é mais prevalente em periodontites periapicais persistentes do que *C. albicans*, é possível especular que um modelo *in vitro* deveria ser executado com um

inóculo bacteriano mais concentrado. A biomassa do biofilme duo-espécie não foi favorecida com diferentes protocolos de lavagem pós-adesão ou de agitação, e o período de 48 h demonstrou ser apropriado para a maturação do biofilme, como demonstrado anteriormente (DIOGO et al., 2017; JACOB et al., 2020; SANGALLI et al., 2018). O modelo desenvolvido neste trabalho padronizou a formação de biofilme duo-espécie em atmosfera de microaerofilia a fim de reproduzir o ambiente oral, como previamente descrito (ALSHANTA et al., 2022; DU et al., 2021; JACOB et al., 2020; SANGALLI et al., 2018).

No presente estudo, a aplicabilidade do modelo de biofilme duo-espécie proposto para avaliar a atividade antimicrobiana também foi investigada. O principal propósito da abordagem foi investigar o comportamento de cada patógeno frente a eficaz inibição do outro pelo tratamento antimicrobiano. Apesar de amoxicilina, metronidazol e/ou tetraciclina serem comumente utilizados na prática endodôntica, eles apresentam algumas limitações: *E. faecalis* é intrinsecamente resistente a  $\beta$ -lactâmicos como a amoxicilina (ROSSELLI DEL TURCO et al., 2021), enquanto metronidazol e tetraciclina levam mais de cinco dias para serem efetivos contra biofilmes de *E. faecalis* (GHABRAEI et al., 2018). Além disso, amoxicilina já foi descrita como sendo capaz de aumentar a virulência de *C. albicans* (DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2019). De acordo com as diretrizes do CLSI e EUCAST, VAN e AMB são antimicrobianos adequados contra *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. Apesar de VAN e AMB reduzirem a carga de *E. faecalis* e *C. albicans* respectivamente, o primeiro demonstrou efeito estimulante em *C. albicans*.

Este trabalho revelou que VAN induziu aumento na biomassa do biofilme duo-espécie e permitiu crescimento de *C. albicans*. Biofilmes tratados com VAN apresentaram um aumento do conteúdo de quitina quando comparado com os controles. Estudos prévios demonstraram que VAN apresenta efeito estimulante em propriedades de *C. albicans* (AGUIAR CORDEIRO et al., 2018; DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2021). Esses resultados sugerem que VAN pode exercer impacto em biofilmes duo-espécie bacterianos e fúngicos. Adicionalmente, AMB também induziu aumento na contagem de ufc de *E. faecalis*. *E. faecalis* pode ter se beneficiado da ausência de competição com *C. albicans* e também células mortas de leveduras podem ter servido como fonte nutricional para a bactéria. Baseado nos resultados aqui presentes, é possível especular que a terapia antimicrobiana na infecção endodôntica deve incluir componentes com propriedades tanto antibacterianas como antifúngicas, uma vez que essas doenças poli microbianas ocorrem em um complexo ambiente microbiano. O tratamento de periodontite periapical persistente com uso prolongado e indiscriminado de antimicrobiano pode resultar em disbiose indesejada, resistência antimicrobiana e complicações durante o

tratamento. Diante disso, a terapia antimicrobiana contra infecções endodônticas deve incluir drogas eficazes contra bactérias e fungos simultaneamente.

Análise ultraestrutural dos biofilmes duo-espécie mostraram predominância de leveduras de *C. albicans* em vez de hifas, e a interação física entre bactéria e fungos como mostrado anteriormente (FU et al., 2021; JACOB et al., 2020; LOHSE et al., 2018). A redução da contagem de UFC de *E. faecalis* provocada pela VAN permitiu a observação de uma hifa de *C. albicans*. De acordo com (Abusrewill et al. (2020), é possível sugerir que essas estruturas podem facilitar o acesso de bactérias remanescentes nos túbulos dentinários.

Análises de MCLV confirmaram a formação do biofilme proposto e mostrou que, independentemente da redução significativa da espessura e biovolume do biofilme após tratamento com os antimicrobianos, a completa e simultânea eliminação de ambas bactérias e fungos não foi alcançada. Isso pode possivelmente ser similar ao cenário clínico que ocorre em periodontites periapicais persistentes (DELBONI et al., 2017)

Finalmente, a influência da temperatura do crescimento do biofilme duo-espécie deve ser enfatizada. Apesar de vários estudos terem sido realizados a 37 °C (ALSHANTA et al., 2022; DIOGO et al., 2017; DU et al., 2021; FU et al., 2021; JACOB et al., 2020; SANGALLI et al., 2018), o presente estudo revelou uma significativa diferença no que se refere a sensibilidade antimicrobiana, composição bioquímica e morfologia ultraestrutural entre os biofilmes duo-espécies cultivados a 35 °C e 37 °C (dados não publicados, apêndice B). De forma geral, biofilmes duo-espécie de biofilmes cultivados a 37°C apresentaram aumento de tolerância a AMB e VAN e menor biovolume e espessura quando comparados aos crescidos em 35 °C.

A emergente necessidade de novas abordagens para o tratamento endodôntico incentiva a busca por novos irrigantes. Os principais objetivos do tratamento endodôntico são modelar e desinfetar os canais radiculares dos dentes, o que é alcançado pelo tratamento químico-mecânico (ZEHNDER, 2006). Apesar dos avanços tecnológicos no que se refere aos dispositivos para tratamento mecânico, a irrigação continua uma ferramenta indispensável, alcançando zonas dos canais radiculares não acessíveis para instrumentos endodônticos (DIOGUARDI et al., 2018). O irrigante endodôntico ideal deve ter potencial de dissolver matéria orgânica e inorgânica, apresentar amplo espectro de ação antimicrobiana sem apresentar citotoxicidade, e também ser capaz de preservar a microestrutura dental (KANDASWAMY; VENKATESHBABU, 2010; ZEHNDER, 2006).

NaClO é o principal irrigante utilizado na prática endodôntica (DUTNER; MINES; ANDERSON, 2012). No entanto, NaClO possui uma citotoxicidade que pode interferir no

processo de reparação dos tecidos periapicais, e a inadvertida extrusão pode provocar o “acidente com NaClO” (BOUTSIUKIS, C; PSIMMA; VAN DER SLUIS, 2013). Além disso, NaClO pode alterar a elasticidade, força flexural e microdureza da matriz de dentina (PASCON et al., 2009). NaClO é utilizado na prática clínica numa ampla faixa de concentrações, variando de 0,5 % a 8,25 % (CULLEN et al., 2015) e essa falta de consenso na literatura pode explicar a grande variabilidade no que se refere ao seu efeito antibiofilme. O aumento da concentração de NaClO aumenta sua atividade antimicrobiana, mas também seus efeitos indesejáveis (BOUTSIUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022). Pesquisas atuais recomendam NaClO a 2.5 % como a concentração que melhor atende a proposta de atividade antimicrobiana sem causar toxicidade (SIQUEIRA et al., 2020).

A CHX tem sido utilizada em endodontia como um irrigante final ou substituto a NaClO (GOMES et al., 2013). Comparada com NaClO, a CHX, estudos têm sugerido que CHX possui algumas vantagens, como substantividade e menor toxicidade (GOMES et al., 2013). Pesquisas recentes utilizando modelos de biofilme multiespécie demonstraram que CHX apresenta menor efeito antimicrobiano do que NaClO, sendo incapaz de romper a matriz extracelular (BUSANELLO et al., 2019). Além disso, CHX não dissolveu a matriz orgânica e inorgânica, portanto, seu uso como única solução irrigadora não é recomendado (HAAPASALO et al., 2014). PMZ e CPZ já foram descritos como promissores agentes antibacterianos e antifúngicos, sendo capazes de inibir as bombas de efluxo de prótons em biofilmes monoespécie (BAUGH et al., 2014), gerar espécies radicais de oxigênio e danificar a membrana celular bacteriana (AGUILAR-VEGA et al., 2021). Estudos anteriores demonstraram que as fenotiazinas são capazes de aumentar a atividade de antimicrobiana de antibióticos contra células planctônicas e biofilmes bacterianos e fúngicos (MARTINS et al., 2004; RAHBAR; MEHRGAN; HADJI-NEJAD, 2010; SIDRIM et al., 2017).

Seguindo as instruções do CLSI, a CIM de NaClO contra *E. faecalis* e *C. albicans* encontradas no presente estudo foi de 2500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Diluição 1:4) e 625  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Diluição 1:16), respectivamente. Esses achados se aproximam ao de Arslan et al. (2011), com apenas uma diluição de diferença. Ainda nos ensaios planctônicos, a CIM de ambas as fenotiazinas para *C. albicans* foi maior do que a CIM para *E. faecalis*. Porém, os ensaios antibiofilme, *C. albicans* foi erradicada dos biofilmes duo-espécie. Essas inconsistências nos resultados dos ensaios podem ser explicadas pelos seguintes motivos: (1) No ensaio antibiofilme, as concentrações utilizadas foram 10x a CIM da PMZ e da CPZ (1280  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); A presença de *E. faecalis* no biofilme duo-espécie pode estar modulando a susceptibilidade de *C. albicans* aos antimicrobianos, uma vez que uma interação de antagonismo já foi sugerida por esses patógenos

pelos resultados encontrados na primeira parte do presente estudo.

PMZ e CPZ já foram descritos como potenciais agentes antibacterianos e antifúngicos, sendo capazes de inibir bombas de efluxo em biofilmes monoespécie (BAUGH et al., 2014), gerar radicais livres e induzir dano à membrana celular bacteriana (AGUILAR-VEGA et al., 2021). Uma vez que o efeito antimicrobiano de CHX é devido a sua eficácia contra membrana celular (HAAPASALO et al., 2014), pode-se especular que isso pode ser aprimorado pelo efeito que as fenotiazinas exercem nas bombas de efluxo presentes na membrana.

Estudos anteriores demonstraram que as fenotiazinas aumentam a atividade de antibióticos contra células planctônicas de patógenos bacterianos e espécies de *Candida* (GALGÓCZY et al., 2011; HENDRICKS et al., 2005; MARTINS et al., 2004; RAHBAR; MEHRGAN; HADJI-NEJAD, 2010). Rahbar et al. (2010) e Hendricks et al. (2005) encontraram um aumento da atividade antimicrobiana dos antibióticos Vancomicina e Ampicilina contra *Enterococcus* sp. quando esses foram associados à fenotiazinas. Galgóczy et al. (2013) descreveram o aumento da susceptibilidade de espécies de *Candida* a Anfotericina B após a associação com fenotiazinas. A respeito da susceptibilidade de células planctônicas, o presente estudo concorda com outros estudos avaliando a CIM de PMZ e CPZ contra *E. faecalis* e *C. albicans* (GALGÓCZY et al., 2011; RAHBAR; MEHRGAN; HADJI-NEJAD, 2010).

PMZ e CPZ também mostraram efeito inibitório contra biofilmes monoespécie de ambos patógenos bacterianos e fúngicos. Avaliando o efeito de fenotiazinas contra fungos, Ells et al. (2013) descreveram a capacidade das fenotiazinas de reduzir significativamente a biomassa de biofilmes de *C. albicans* quando comparado com o controle. O presente estudo encontrou que PMZ e CPZ afetaram a viabilidade de *C. albicans* e, portanto, é possível especular que o efeito antibiofilme de ambas as fenotiazinas contra o biofilme duo-espécie pode estar relacionado ao seu efeito contra *C. albicans*. A cerca do efeito das fenotiazinas contra bactérias, Aguilar-Vega et al. (2021) descreveram que ambos PMZ e CPZ reduziram biofilmes de *A. baumannii* e CPZ foi capaz de induzir dano na membrana celular bacteriana. No presente estudo, ambas as fenotiazinas reduziram a biomassa dos biofilmes, no entanto somente PMZ foi capaz de reduzir significativamente o ufc de *E. faecalis*. Isso pode ser devido a diferença na arquitetura da parede celular ou em fatores de virulências das espécies bacterianas que resultam em diferença de sensibilidade.

A análise de composição bioquímica após o tratamento pode traduzir o efeito das substâncias testadas nas células e matriz extracelular dos biofilmes. O conteúdo de quitina dos biofilmes duo-espécie foi significativamente reduzido após o tratamento com NaClO, PMZ, CPZ e PMZ+CHX, o que concordo com o efeito dessas substâncias no ufc de *C. albicans*. O

conteúdo proteico dos biofilmes só foi significativamente reduzido após tratamentos com NaClO e PMZ, sendo NaClO o mais eficaz. O conteúdo geral de carboidratos dos biofilmes foi reduzido significativamente após todos os tratamentos, especialmente após exposição a NaClO e PMZ. Os carboidratos presentes na parede celular microbiana e nos biofilmes exercem um papel fundamental na resposta do sistema imune do hospedeiro contra a infecção (GARCIA-RUBIO et al., 2020; HANCOCK; MURRAY; SILLANPÄÄ, 2014). A maioria dos sintomas clínicos das periodontites periapicais são devidas a resposta imune periodontal ao biofilmes colonizando o sistema de canais radiculares (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2022). Portanto, é válido especular que após o tratamento com as substâncias testadas, os patógenos devem induzir uma resposta inflamatória reduzidas aos tecidos periodontais. A capacidade de NaClO de reagir e romper aminoácidos e carboidratos já foi descrita previamente (DIOGUARDI et al., 2020), o que pode ser associado com sua capacidade de formar ácido hipocloroso. Brilhante et al. (2017) encontraram que a associação de azólicos com PMZ reduziu o efluxo de rodamina G, induziu a diminuição do tamanho celular e granularidade, provocou danos a membrana celular e despolarização da membrana mitocondrial. CHX não apresentou efeito no conteúdo de quitina, no entanto, a habilidade de CHX de reduzir o conteúdo geral de carboidratos já foi previamente descrito, o que concorda com o presente estudo (BISWAS; TIWARI; TIWARI, 2019).

O presente estudo não encontrou sinergismos entre a atividade antimicrobiana de CHX e as fenotiazinas PMZ e CPZ. Além disso, as análises de MCLV e composição bioquímica revelaram que o efeito de redução da espessura dos biofilmes e do conteúdo de carboidratos e proteínas induzido pelas fenotiazinas foi menor após a associação com CHX. De forma subjetiva, pode-se inferir pelas imagens de MCLV que as fenotiazinas apresentaram efeito antibiofilme menor do que NaClO, porém maior do que CHX, PMZ+CHX e CPZ+CHX. Isso pode ser devido a competição pelo alvo de ação. Como o efeito antimicrobiano de CHX é devido sua efetividade contra membrana celular microbiana, isso pode estar prevenindo a ação de inibição das bombas de efluxo pelas fenotiazinas. Recentemente, estudos já descreveram interações de sinergismo (BAYKULOVA, 2022; ÖZDEMIR et al., 2022) e indiferença (SCELZA et al., 2022) entre CHX e outros antimicrobianos. Surpreendentemente, uma indução de multirresistência a antimicrobianas de *E. faecalis* após a exposição a doses subletais e CHX já foi descrita anteriormente (KAMPF, 2019).

Apesar do potencial efeito antibiofilme de PMZ e CPZ descrito no presente estudo, diversos aspectos devem ser levados em consideração antes de recomendar essas substâncias como irrigantes endodônticos, como biocompatibilidade, efeito na matriz dentinária e capacidade de dissolução de matéria orgânica. Mesmo que essas drogas já tenham sido

utilizadas na clínica com vários propósitos, a sua abordagem para prática odontológica ainda é pouco investigada. Em termos de pesquisa endodôntica, Batinić et al. (2018) utilizou derivados de fenotiazinas como corantes para a terapia fotodinâmica contra biofilmes monoespécie de *E. faecalis*, porém o efeito antimicrobiano individual das fenotiazinas não foi investigado. Também é importante enfatizar que o amplo uso das fenotiazinas na prática clínica é restrito às doenças sistêmicas, logo seu efeito em forma de administração local pode apresentar diferentes resultados. Além disso, é possível especular que a concentração nas fenotiazinas utilizadas no presente estudo deva ser ajustada baseada nas condições ambientais adversas da cavidade oral, que incluem variações de pH, osmolaridade e presença de substâncias orgânicas que podem afetar sua atividade antimicrobiana.

Dentro das limitações do presente estudo, as diferenças de citotoxicidade entre as soluções testadas não foram investigadas. É bem descrito que o aumento da concentração das drogas pode levar ao aumento da atividade antimicrobiana, porém isso também eleva sua citotoxicidade às células do hospedeiro (WONG et al., 2021). Apesar da relativa menor citotoxicidade de CHX quando comparada com NaClO, essa bisbinaguida catiônica em concentrações elevadas pode apresentar efeitos adversos contra as células do hospedeiro (BOUSIUKIS; ARIAS-MOLIZ, 2022). Por isso, tentar otimizar a atividade antimicrobiana de CHX sem elevar sua concentração parece ser uma estratégia razoável. Essa abordagem pode ser alcançada através da combinação de CHX com outras substâncias antimicrobianas. Porém, é importante lembrar que PMZ e CPZ possuem a capacidade de induzir dano celular e liberação de radicais de espécies de oxigênio, o que pode contribuir com a citotoxicidade (AGUILAR-VEGA et al., 2021; BRILHANTE et al., 2017). Portanto, os autores sugerem que a citotoxicidade de PMZ e CPZ contra células periodontais (como fibroblastos) deve ser investigada em estudos futuros.

Estudos recentes têm demonstrado crescente interesse em interações *interkingdom* entre espécies de interesse clínico e sua repercussão no estabelecimento de doenças. *C. albicans* é a espécie fúngica de maior relevância em clínica médica e odontológica, por isso, seu impacto no comportamento de patógenos bacterianos vem sendo descrito. Na literatura, podemos encontrar diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos abordando repercussões da coinfeção *interkingdom* de bactérias e fungos na resposta à terapia antimicrobiana (BOWEN et al., 2018; CRUZ et al., 2013; KRÜGER et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2019). No contexto de infecções orais, existe significativa evidência da importância da interação *C. albicans* com espécies bacterianas no desenvolvimento de diversas patologias, como cáries, periodontites e infecções endodônticas (DELANEY et al., 2018; PERSON; CRIELAARD; ÖZOK, 2017; YOUNG et al., 2021).

A interação *E. faecalis* e *C. albicans* na cavidade oral já foi previamente descrita na literatura, sendo *E. faecalis* uma das espécies bacterianas mais frequentemente coisoladas de amostras clínicas com *C. albicans*, incluindo de canais radiculares (HERMANN et al., 1999; KOVAC et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2019; PECIULIENE et al., 2001). A respeito da natureza da interação *E. faecalis* e *C. albicans*, existe discordância na literatura, sendo já sugerido uma relação de mutualismo (DIOGO et al., 2017; DONNERT et al., 2020; DU et al., 2021; GAO et al., 2016) ou competição (CRUZ et al., 2013; GRAHAM et al., 2017; KRISHNAMOORTHY et al., 2020). Utilizando a ferramenta de análise por RNAseq, Alshanta et al. (2022) descreveram o impacto que *E. faecalis* exerce no transcriptoma de *C. albicans*, enfatizando que os metabólitos do primeiro são de suma importância para inibir a filamentação do fungo através da diminuição de pH. No entanto, para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos nessa bactéria-fungo, uma investigação acerca do transcriptoma de *E. faecalis* também é necessária.

As análises de RNAseq no presente estudo revelaram que a presença de *C. albicans* induziu em *E. faecalis* um aumento na expressão gênica significativa de transportadores de açúcares, denominados transportadores de fosfoenolpiruvato (PTS). Esses transportadores bacterianos utilizam uma molécula de fosfoenolpiruvato para adequar a absorção e fosforilação de açúcares em resposta a disponibilidade de açúcares e a sinais ambientais, tendo influência no sistema repressor de catabolismo de carboidratos (CCR), no metabolismo (níveis de carbono e nitrogênio, síntese de glicogênio), na quimiotaxia e virulência bacterianas (JECKELMANN; ERNI, 2020). Os transportadores PTS consistem em duas proteínas fosfotransferases citoplasmáticas, denominadas EI e Hpr, e uma proteína transmembrana EII que se divide em subunidades (A, B, C, D). Essa última apresenta especificidade para cada tipo de açúcar (HASSAN et al., 2014). Ao analisar a lista de genes relacionados com os transportadores PTS, O opéron OG1RF\_10018, OG1RF\_10019, OG1RF\_10020 e OG1RF\_10021 (manX, manX2 e manY) chama a atenção devido sua homologia acima de 60 % com outros transportadores PTS para manose descritos anteriormente (SUNDAR et al., 2017) e também pelo fato da parede celular fúngica de *C. albicans* apresentar polímeros de manose que podem estar modulando a atividade desses transportadores (GARCIA-RUBIO et al., 2021).

Os ensaios de monitoramento de crescimento com *Bioscreen* das cepas OG1RF *wild type* e mutantes revelaram uma redução no crescimento das cepas mutantes por inserção nos loci OG1RF\_10019, OG1RF\_10020 e OG1RF\_10021 quando a única fonte de carboidrato era manose. Esses resultados sugerem que esses genes possuem uma influência na absorção de manose por *E. faecalis*. Porém, devido ao caráter promíscuo e ambíguo de transportadores PTS,

outros transportadores podem estar compensando essa deleção, evitando a total inibição do crescimento e mantendo uma curva reduzida de crescimento (SUNDAR et al., 2017). Embora o óperon de interesse também esteja anotado para transporte de frutose, não foi detectada redução de crescimento das cepas mutantes quando cultivadas em meio contendo esse açúcar como única fonte de carboidrato.

De acordo com os achados de RNAseq, o ensaio de atividade de transportador PTS revelou que a atividade desses transportadores para manose de *E. faecalis* OG1RF *wild-type* foi estimulada na presença de *C. albicans*. Isso reforça a hipótese de que a manana na parede celular fúngica pode estar estimulando a absorção de manose. No entanto, esse quadro também pode sugerir uma mudança no CCR de *E. faecalis* devido à escassez nutricional induzida pela competição com *C. albicans*, que podem estar induzindo a bactéria a buscar fontes alternativas de carboidratos. Essa segunda hipótese é reforçada pela detecção de uma redução significativa na concentração de glicose nos sobrenadantes do biofilmes duo-espécie quando comparado com os biofilmes monoespécie de *E. faecalis*. Além disso, a elevação do pH dos sobrenadantes dos biofilmes duo-espécie em relação ao biofilme monoespécie de *E. faecalis* sugere a ocorrência de mudanças significativas no metabolismo bacteriano e fúngico quando em cocultura. Essa mudança de rota metabólica pode estar sendo conduzida através de modificações no CCR bacteriano. O CCR é um mecanismo regulador global bacteriano responsável por inibir a expressão e função para o uso de fontes alternativas de carboidrato quando uma fonte de carbono preferida está presente, como a glicose. Essa modulação de absorção de carboidratos tem impacto direto da virulência e adaptabilidade bacteriana (GÖRKE; STÜLKE, 2008). O aumento da expressão de transportadores PTS para manose, frutose e outros açúcares além da glicose açúcares na presença de *C. albicans* sugere que o fungo em questão pode estar suprimindo o CCR de *E. faecalis* tanto através da presença de manose em sua parede como pela competição nutricional.

É razoável teorizar que a mudança metabólica de *E. faecalis* induzida pela presença *C. albicans* pode estar afetando a virulência bacteriana. No presente estudo, ao comparar a formação de biofilmes utilizando glicose ou manose como única fonte de carbono, *E. faecalis* tanto em biofilme monoespécie como duo espécie demonstrou ser capaz de formar biofilmes com maiores contagens de ufc e biomassa na presença de manose. Os ensaios *in vivo* em invertebrado *G. mellonella* sugeriram um aumento de virulência da coinfeção quando comparada com a monoinfeção por *E. faecalis* e a monoinfeção por *C. albicans*. Esses resultados discordam com Cruz et al. (2013), que utilizando modelo invertebrado de *Caenorhabditis elegans*, identificaram atenuação da virulência de *C. albicans* na presença de

*E. faecalis* através da inibição da filamentação fúngica. É necessário enfatizar que a interpretação dos ensaios de análise de virulência pode depender do da técnica experimental utilizada e do contexto clínico investigado. No caso de periodontites periapicais persistentes, onde a disponibilidade nutricional é limitada, um incentivo a variabilidade metabólica pode beneficiar a sobrevivência de *E. faecalis* no interior dos canais radiculares.

## 8 CONCLUSÕES

Variações físico-químicas interferem diretamente nas interações entre *E.faecalis* e *C.albicans*, levando a alterações significantes em biofilmes duo-espécie *in vitro*. Entre as abordagens descritas neste estudo, o uso de caldo BHI, a 35 °C, por 48 h em atmosfera de microaerofilia otimizou o crescimento dos biofilmes duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, sendo estabelecida como um modelo para pesquisa endodôntica. Estudos posteriores objetivando o aprimoramento da simulação da cavidade oral, como flutuações de pH, substratos orgânicos e inorgânicos, e particularidades nutricionais, devem ser realizados para avaliar o modelo de biofilme duo-espécie. Em acordo com pesquisas anteriores, a caracterização do modelo sugerido revelou que *E. faecalis* e *C. albicans* possuem uma direta influência sobre o comportamento de cada um, causando impacto e consequências no tratamento antimicrobiano.

Nas condições experimentais tratadas, entre as duas fenotiazinas testadas, PMZ foi a mais eficaz contra biofilme duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*. NaClO e PMZ foram capazes de reduzir a biomassa, a contagem de unidades de colônia de ambos os micro-organismos, biovolume, espessura e conteúdo de carboidratos e proteínas dos biofilmes. A associação de CHX com PMZ e CPZ não se mostrou vantajosa para atividade antimicrobiana contra micro-organismos planctônicos e em biofilmes.

A presença de *C. albicans* em biofilmes de *E. faecalis* induziu aumento de expressão gênica e atividade de transportadores PTS de manose. Constatou-se que a absorção de manose beneficia a formação de biofilmes monoespécie de *E. faecalis* e biofilmes duo espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*. Em modelo *in vivo*, a taxa de sobrevivência da coinfeção foi menor que a mono infecção por *E. faecalis* ou *C.albicans*.

Como conclusão, é possível sugerir que *E.faecalis* e *C.albicans* apresentam mútuo impacto em aspectos de sua virulência, principalmente os relacionados com a formação de biofilmes. Abordar os efeitos dessa interação é fundamental para compreender não apenas a dinâmica do desenvolvimento de doenças endodônticas, mas também prever possíveis complicações que uma abordagem exclusivamente antibacteriana ou antifúngica pode resultar.

## REFERÊNCIAS

- ABUSREWIL, S. et al. Detection, treatment and prevention of endodontic biofilm infections: what's new in 2020? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 194–212, 2020.
- AGUIAR CORDEIRO, R. De et al.  $\beta$ -lactam antibiotics & vancomycin increase the growth & virulence of *Candida* spp. **Future Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 869–875, 2018.
- AGUILAR-VEGA, L. et al. Antibacterial properties of phenothiazine derivatives against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 2235–2243, 2021.
- ALGHAMDI, F.; SHAKIR, M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. **Cureus**, v. 12, n. 3, 2020.
- ALSHANTA, O. A. et al. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* biofilm frenemies: When the relationship sours. **Biofilm**, v. 4, p. 100072, 2022.
- ARDIZZONI, A. et al. In vitro effects of commercial mouthwashes on several virulence traits of *Candida albicans*, *viridans streptococci* and *Enterococcus faecalis* colonizing the oral cavity. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 2018.
- ARORA, S.; GORDON, J.; HOOK, M. Collagen Binding Proteins of Gram-Positive Pathogens. **Frontiers in Microbiology**. [S.l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2021
- ARSLAN, S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Saudi Medical Journal**, v. 32, n. 5, p. 479–483, 2011.
- BATINIĆ, M. et al. Comparison of final disinfection protocols using antimicrobial photodynamic therapy and different irrigants after single-file reciprocating instrumentation against intracanal bacterial biofilm — An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 153–157, 2018.
- BAUGH, S. et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 673–681, 2014.
- BAYKULOVA, S. B. Assessment of antimicrobial activity of bioflavonoid CITROX and chlorhexidine combination against *P. gingivalis* (in vitro)]. **Stomatologija**, v. 101, n. 2, p. 14–18, 2022.
- BAZZINI, S. et al. Deciphering the role of rnd efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- BERTOLINI, M.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. The Relationship of *Candida albicans*

with the Oral Bacterial Microbiome in Health and Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1197, p. 69–78, 2019.

BISWAS, D.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Molecular mechanism of antimicrobial activity of chlorhexidine against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 10, p. e0224107, 2019.

BOUILLAGUET, S. et al. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, n. OCT, p. 2374, 2018.

BOUSIOUKIS, C; PSIMMA, Z.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Factors affecting irrigant extrusion during root canal irrigation: A systematic review. **International Endodontic Journal**. [S.l: s.n.], , 2013

BOUSIOUKIS, Christos; ARIAS-MOLIZ, M. T. Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. **International Endodontic Journal**. [S.l.]: Wiley, , 2022

BOWEN, W. H. et al. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 3, p. 229–242, 2018.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**. [S.l.]: Nat Rev Microbiol. , 2016.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* complex species. **Medical Mycology**, v. 58, n. 7, p. 906–912, 2020.

\_\_\_\_\_. Biofilms of *Candida* spp. from the ocular conjunctiva of horses with reduced azole susceptibility: a complicating factor for the treatment of keratomycosis? **Veterinary Ophthalmology**, v. 20, n. 6, p. 539–546, 2017.

BUKHARY, S.; BALTO, H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 4, p. 643–647, 2017.

BURMØLLE, M. et al. Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? **Trends in Microbiology**. [S.l.]: Trends Microbiol. , 2014

BUSANELLO, F. H. et al. Chemical biofilm removal capacity of endodontic irrigants as a function of biofilm structure: optical coherence tomography, confocal microscopy and viscoelasticity determination as integrated assessment tools. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 4, p. 461–474, 2019.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 2001.

- CHANG, J. C. et al. Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 8, 2011.
- CHEN, B. et al. Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19? **Environmental Pollution**, v. 283, n. April, 2021.
- CIOFU, O. et al. Tolerance and resistance of microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**. [S.l: s.n.], 2022
- CLARK, H. L. et al. Atovaquone impairs growth of *Aspergillus* and *fusarium* keratitis isolates by modulating mitochondrial function and zinc homeostasis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 59, n. 3, p. 1589–1598, 2018.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. [S.l: s.n.], 2022a. v. 11.
- \_\_\_\_\_. M27 | Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. **Reference Method for broth dilutions antifungal susceptibility testing for yeasts**, v. 42, n. 4, 2022b.
- COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**. [S.l.]: Future Science Ltd. , 2007
- CORDEIRO, R. D. A. et al. Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. **Future Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 9–20, 2020.
- CORDEIRO, R. de A. et al. The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, n. 8, p. 640–650, 2017.
- CRUZ, M. R. et al. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 189–200, 2013.
- CULLEN, J. K. T. et al. The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 6, p. 920–924, 2015.
- DAHLÉN, G. et al. Virulence factors and antibiotic susceptibility in *Enterococci* isolated from oral mucosal and deep infections. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, n. 2012, 2012.
- DE AGUIAR CORDEIRO, R.; DE OLIVEIRA, J. S.; et al. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 145–152, 2015.
- DE AGUIAR CORDEIRO, R. et al. Cefepime and amoxicillin increase metabolism and

- enhance caspofungin tolerance of *Candida albicans* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, 2019.
- DE AGUIAR CORDEIRO, R.; SERPA, R.; et al. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1277–1286, 2015.
- DE AGUIAR CORDEIRO, R. et al. Vancomycin enhances growth and virulence of *Trichosporon* spp. planktonic cells and biofilms. **Medical Mycology**, v. 59, n. 8, p. 793–801, 2021.
- DE MELLO FIALLOS, N. et al. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* dual-species biofilm: establishment of an *in vitro* protocol and characterization. **Biofouling**, p. 1–13, 2022.
- DELANEY, C. et al. Fungi at the Scene of the Crime: Innocent Bystanders or Accomplices in Oral Infections? **Current Clinical Microbiology Reports**. [S.l.]: Springer. , 2018
- DELBONI, M. G. et al. Diversity of *Enterococcus faecalis* Genotypes from Multiple Oral Sites Associated with Endodontic Failure Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 3, p. 377–382, 2017.
- DIAZ, P. I. Subgingival fungi, Archaea, and viruses under the omics loupe. **Periodontology 2000**. [S.l.]: Periodontol 2000. , 2021
- DIOGO, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* mono and mixed biofilms in the presence of photosensitizers: A comparative study with classical endodontic irrigants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 498, 2017.
- DIOGUARDI, M. et al. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. **European Journal of Dentistry**. [S.l.]: Wolters Kluwer Medknow Publications. , 2018
- DIOGUARDI, M.; QUARTA, C.; et al. Microbial association with genus Actinomyces in primary and secondary endodontic lesions, review. **Antibiotics**. [S.l.]: Antibiotics (Basel). , 2020
- DIOGUARDI, M.; ALOVISI, M.; et al. Prevalence of the genus *Propionibacterium* in primary and persistent endodontic lesions: A systematic review. **Journal of Clinical Medicine**. [S.l.]: J Clin Med. , 2020
- DONNERT, M. et al. Targeting bioenergetics is key to counteracting the drug-tolerant state of biofilm-grown bacteria. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 12, 2020.
- DU, Q. et al. Coexistence of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* increases biofilm

- virulence and periapical lesions in rats. **Biofouling**, v. 37, n. 9–10, p. 964–974, 2021.
- DUTNER, J.; MINES, P.; ANDERSON, A. Irrigation trends among american association of endodontists members: A web-based survey. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 1, p. 37–40, 2012.
- DUTTON, L. C. et al. Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 3, 2016.
- EDDY, R. S. et al. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 9, p. 672–675, 2005.
- EICK, S. Biofilm Models for the Evaluation of Dental Treatment. **Monographs in Oral Science**. [S.l.]: Monogr Oral Sci. , 2020
- ELISE, M. et al. Characteristics of *Aspergillus fumigatus* in association with *Stenotrophomonas maltophilia* in an in vitro model of mixed biofilm. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166325, 2016.
- ELLS, R. et al. Phenothiazine is a potent inhibitor of prostaglandin E2 production by *Candida albicans* biofilms. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 8, p. 849–855, 2013.
- ENDO, M. S. et al. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. **European Journal of Dentistry**, v. 7, n. 3, p. 302–309, 2013.
- FERREIRA, R. B. et al. Effectiveness of root canal debris removal using passive ultrasound irrigation with chlorhexidine digluconate or sodium hypochlorite individually or in combination as irrigants. **The journal of contemporary dental practice**, v. 9, n. 5, p. 068–075, 2008.
- FIALLOS, N. de M. et al. Antimicrobial effectiveness of grape seed extract against *Enterococcus faecalis* biofilm: A Confocal Laser Scanning Microscopy analysis. **Australian Endodontic Journal**, v. 46, n. 2, p. 191–196, 2020.
- FOX, E. P. et al. Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. **Current Biology**, v. 24, n. 20, p. 2411–2416, 2014.
- FRASER, V. J. et al. Candidemia in a tertiary care hospital: Epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 414–421, 1992.
- FU, Y. et al. Antibiofilm Efficacy of Luteolin Against Single and Dual Species of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021.
- GACA, A. O.; LEMOS, J. A. Adaptation to Adversity: the Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in *Enterococci*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 3, 2019.

- GALGÓCZY, L. et al. In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. **Mycoses**, v. 54, n. 6, 2011.
- GAO, Y. et al. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 8, p. 1233–1238, 2016.
- GARCIA-RUBIO, R. et al. Critical Assessment of Cell Wall Integrity Factors Contributing to in vivo Echinocandin Tolerance and Resistance in *Candida glabrata*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
- \_\_\_\_\_. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Frontiers in Microbiology**. [S.l.]: Frontiers Media SA. , 2020
- GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**. [S.l.]: Clin Microbiol Rev. , 2019
- GARSIN, D. A.; LORENZ, M. C. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in the gut: Synergy in commensalism? **Gut Microbes**, v. 4, n. 5, p. 409–415, 2013.
- GHABRAEI, S. et al. Comparison of Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Mixed with 2% Chlorhexidine as Intracanal Medicaments Against *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Journal of dentistry (Tehran, Iran)**, v. 15, n. 3, p. 151–160, 2018.
- GHIVARI, S. et al. Antimicrobial activity of root canal irrigants against biofilm forming pathogens- An in vitro study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 3, p. 147, 2017.
- GOH, H. M. S. et al. Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. **Virulence**. [S.l.]: Taylor & Francis. , 2017
- GOMES, B. P. F. A. et al. Chlorhexidine in endodontics. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 2, p. 89–102, 2013.
- \_\_\_\_\_. Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 7, p. 1075–1086, 2021.
- GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 2008
- GRAHAM, C. E. et al. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 17, p. 4507–4512, 2017.
- GU, L. sha et al. Primum non nocere – The effects of sodium hypochlorite on dentin as used

- in endodontics. **Acta Biomaterialia**, v. 61, p. 144–156, 2017.
- GUIVARC'H, M. et al. **Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review**. **Journal of Endodontics**. [S.l.]: Elsevier Inc. , 2017
- GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**. [S.l.]: NIH Public Access. , 2016
- GUTIÉRREZ, D. M. et al. A new model for the formation of an *Enterococcus faecalis* endodontic biofilm with nutritional restriction. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 13–21, 2022.
- HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **British dental journal**, v. 216, n. 6, p. 299–303, 2014.
- HAAS, W.; SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 84–87, 2002.
- HANCOCK, L. E.; MURRAY, B. E.; SILLANPÄÄ, J. Enterococcal Cell Wall Components and Structures. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**, 2014.
- HARALUR, S. B. et al. Effect of Dentin-Disinfection Chemicals on Shear Bond Strength and Microhardness of Resin-Infiltrated Human Dentin in Different Adhesive Protocols. **Medicina (Lithuania)**, v. 58, n. 9, 2022.
- HASSAN, K. A. et al. Microbial Solute Transporters. **Ref. Modul. Biomed. Sci.** [S.l.]: Elsevier, 2014. .
- HENDRICKS, O. et al. In vitro activity of phenothiazine derivatives in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 33–36, 2005.
- HERMANN, C. et al. Bacterial flora accompanying *Candida* yeasts in clinical specimens. **Mycoses**, v. 42, n. 11–12, p. 619–627, 1999.
- JACOB, V. P. et al. Antimicrobial action of NeoMTA Plus on mono- and dual-species biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. **Archives of Oral Biology**, v. 120, 2020.
- JECKELMANN, J. M.; ERNI, B. The mannose phosphotransferase system (Man-PTS) - Mannose transporter and receptor for bacteriocins and bacteriophages. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**. [S.l.]: Elsevier B.V. , 2020
- KAMPF, G. Antibiotic resistance can be enhanced in gram-positive species by some biocidal agents used for disinfection. **Antibiotics**. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute

(MDPI). , 2019

KANDASWAMY, D.; VENKATESHBABU, N. Root canal irrigants. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 13, n. 4, p. 256, 2010.

KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**. [S.l.]: Crit Rev Oral Biol Med. , 2004

KLOTZ, S. A. et al. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 59, n. 4, p. 401–406, 2007.

KOO, H.; ANDES, D. R.; KRYSAN, D. J. *Candida*–streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. **PLoS Pathogens**. [S.l.]: PLoS Pathog. , 2018

KOVAC, J. et al. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. **Bratislava Medical Journal**, v. 114, n. 12, p. 716–720, 2013.

KRAWCZYK, B. et al. The many faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**. [S.l.: s.n.]. , 2021

KRISHNAMOORTHY, A. L. et al. Interactions between *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in an organotypic oral epithelial model. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2020.

KRITHIKADATTA, J.; INDIRA, R.; DOROTHYKALYANI, A. L. Disinfection of Dentinal Tubules with 2% Chlorhexidine, 2% Metronidazole, Bioactive Glass when Compared with Calcium Hydroxide as Intracanal Medicaments. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 12, p. 1473–1476, 2007.

KRÜGER, W. et al. **Fungal-bacterial interactions in health and disease**. **Pathogens**. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). , 2019

LAPLANTE, K. L.; MERMEL, L. A. In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3166–3169, 2009.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510–543, 2014.

LEBLANC, D. J. et al. Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by *Streptococcus lactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 2, p. 878–884, 1979.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**. [S.l.: s.n.], 2014.

LEUCK, A. M.; JOHNSON, J. R.; DUNNY, G. M. A widely used in vitro biofilm assay has

- questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107282, 2014.
- LI, D. D. et al. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 2013.
- LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 2018
- MACHADO, F. P. et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 9, p. 3169–3179, 2020.
- MADLA-CRUZ, E. et al. Antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation in vitro and on human dentine by silver nanoparticles/carboxymethyl-cellulose composites. **Archives of Oral Biology**, v. 120, 2020.
- MAH, T. F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**. [S.l.]: Future Microbiol. , 2012
- MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of clinical periodontology**, v. 44 Suppl 18, p. S12–S22, 2017.
- MARSLAND, B. J.; GOLLWITZER, E. S. Host-microorganism interactions in lung diseases. **Nature Reviews Immunology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 2014
- MARTINS, M. et al. Clinical concentrations of thioridazine enhance the killing of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An in vivo, ex vivo and electron microscopy study. **In Vivo**, v. 18, n. 6, p. 787–794, 2004.
- MERGONI, G. et al. Prevalence of *Candida* Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Endodontics**. [S.l.]: J Endod. , 2018
- MERSEGUEL, K. B. et al. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2015.
- MOHAMMED, M. M. A. et al. Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, n. 2013, 2013.
- MORALES, D. K.; HOGAN, D. A. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–4, 2010.
- NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current Opinion in Microbiology**. [S.l.]: Curr Opin Microbiol. , 2017
- NAIR, P. N. R. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral**

- Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 99, n. 2, p. 231–252, 2005.
- NASH, A. K. et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 153, 2017.
- NEELAKANTAN, P. et al. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, 2017.
- NOGUEIRA, F. et al. **Pathogenetic impact of bacterial–fungal interactions. Microorganisms**. [S.l.]: Microorganisms. , 2019
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. [S.l.]: J Antimicrob Chemother. , 2003
- OKINO, L. A. et al. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 1, p. 38–41, 2004.
- ÖZDEMİR, F. N. et al. Determination of an effective agent combination using nisin against *Salmonella* biofilm. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 3, 2022.
- PADNYA, P. L.; KHADIEVA, A. I.; STOIKOV, I. I. Current achievements and perspectives in synthesis and applications of 3,7-disubstituted phenothiazines as Methylene Blue analogues. **Dyes and Pigments**. [S.l.]: Elsevier. , 2022
- PANARIELLO, B. H. elen. D. et al. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. **American journal of dentistry**, v. 29, n. 3, p. 154–160, 2016.
- PASCON, F. M. et al. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. **Journal of Dentistry**. [S.l.]: J Dent. , 2009
- PATEL, M. Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. **Pathogens**. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). , 2022
- PECIULIENE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 6, p. 429–434, 2001.
- PEREIRA, D. F. A. et al. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? **Oral Diseases**. [S.l.]: Oral Dis. , 2018
- PEREIRA, R. S. et al. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. **Anaerobe**, v. 48, p. 12–18, 2017.
- PERSOON, I. F.; CRIELAARD, W.; ÖZOK, A. R. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**. [S.l.]: Int Endod J. , 2017

- PERSOON, I. F.; ÖZOK, A. R. **Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections. Current Oral Health Reports.** [S.l.]: Springer Science and Business Media B.V. , 2017
- POPTANI, B. et al. Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 4, n. 1, p. 62–66, 2013.
- POSSO, M. C. et al. Development of Phenothiazine Hybrids with Potential Medicinal Interest: A Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 1, 2022.
- POWELL, D. **Degust: interactive RNA-seq analysis.** . [S.l: s.n.] , 2022
- PRADA, I. et al. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 24, n. 3, p. e364–e372, 2019.
- QIAN, W. et al. Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis. **BMC Genomics**, v. 20, 2019.
- RAHBAR, M.; MEHRGAN, H.; HADJI-NEJAD, S. Enhancement of vancomycin activity by phenothiazines against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in vitro. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 676–679, 2010.
- RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology.** [S.l.]: Int J Microbiol. , 2012
- RAMOS, Y.; MORALES, D. K. Exopolysaccharide-mediated surface penetration as new virulence trait in *Enterococcus faecalis*. **Communicative & Integrative Biology**, v. 12, n. 1, p. 144, 2019.
- RICHARDS, D.; DAVIES, J. K.; FIGDOR, D. Starvation survival and recovery in serum of *Candida albicans* compared with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 1, p. 125–130, 2010.
- ROSSELLI DEL TURCO, E. et al. **How do I manage a patient with enterococcal bacteraemia? Clinical Microbiology and Infection.** [S.l: s.n.] , 2021
- RUIZ-LINARES, M. et al. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 1, p. 77–83, 2017.
- SAKKO, M.; TJÄDERHANE, L.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R. Microbiology of Root Canal Infections. **Primary dental journal.** [S.l: s.n.] , 2016
- SANGALLI, J. et al. Antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* associated with calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An *in vitro* study. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 6, p. 2273–2279, 2018.
- SCELZA, M. Z. et al. Cytocompatibility and antimicrobial activity of a novel endodontic irrigant combining citric acid and chlorhexidine. **Journal of Dentistry**, v. 125, 2022.

- SCHIRRMEISTER, J. F. et al. New Bacterial Compositions in Root-filled Teeth with Periradicular Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 2, p. 169–174, 2009.
- SEDGLEY, C. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 3, p. 173–177, 2006.
- SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F1000Research**. [S.l.]: F1000 Research Ltd. , 2016
- SENA, N. T. et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 11, p. 878–885, 2006.
- SHEKH, R. M.; ROY, U. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis*. **BMC microbiology**, v. 12, 2012.
- SIDRIM, J. J. C. et al. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, n. 1, p. 88–97, 2017.
- SIEVERT, D. M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2013.
- SIQUEIRA, J F et al. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. **British Dental Journal**, v. 216, n. 6, p. 305–312, 2014.
- SIQUEIRA, José F. et al. The Apical Root Canal System of Teeth with Posttreatment Apical Periodontitis: Correlating Microbiologic, Tomographic, and Histopathologic Findings. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 9, p. 1195–1203, 2020.
- SIQUEIRA, José F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 1, p. 85–94, 2004.
- \_\_\_\_\_. **Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections.** **International Endodontic Journal**. [S.l.]: Int Endod J. , 2022
- SIQUEIRA, José F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 5, p. 632–641, 2004.
- SIQUEIRA, José F et al. Microbiome in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.
- SOARES, L. G. P. et al. Oral microbiological control by photodynamic action in orthodontic patients. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 221–225, 2019.

- SUNDAR, G. S. et al. A PTS EII mutant library in Group A *Streptococcus* identifies a promiscuous man-family PTS transporter influencing SLS-mediated hemolysis. **Molecular microbiology**, v. 103, n. 3, p. 518–533, 2017.
- SWIDERGALL, M.; ERNST, A. M.; ERNST, J. F. *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3917–3922, 2013.
- SWIMBERGHE, R. C. D. et al. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. **International Endodontic Journal**. [S.l.]: Int Endod J. , 2019
- TARTARI, T. et al. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 3, p. 291–298, 2016.
- TELFORD, J. L. et al. *Pili* in gram-positive pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 509–519, 2006.
- THURLOW, L. R. et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4936–4943, 2010.
- TIBÚRCIO-MACHADO, C. S. et al. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**. [S.l.]: Int Endod J. , 2021
- TOBUDIC, S. et al. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 271–274, 2009.
- VAN SCHAIK, W. et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- VIANNA, Morgana E.; GOMES, B. P. F. A. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis in vitro*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 107, n. 4, p. 585–589, 2009.
- VIANNA, Morgana Eli et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 1, p. 79–84, 2004.
- WELLINGHAUSEN, N. et al. Characterization of clinical *Enterococcus faecalis* small-colony variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2802–2811, 2009.
- WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**. [S.l.]: J Oral Microbiol. , 2011
- WITHERDEN, E. A. et al. The human mucosal mycobiome and fungal community

interactions. **Journal of Fungi**. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). , 2017

WONG, J. et al. Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges. **Frontiers in Oral Health**, v. 2, 2021.

XU, H. et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 2, p. 214–231, 2014.

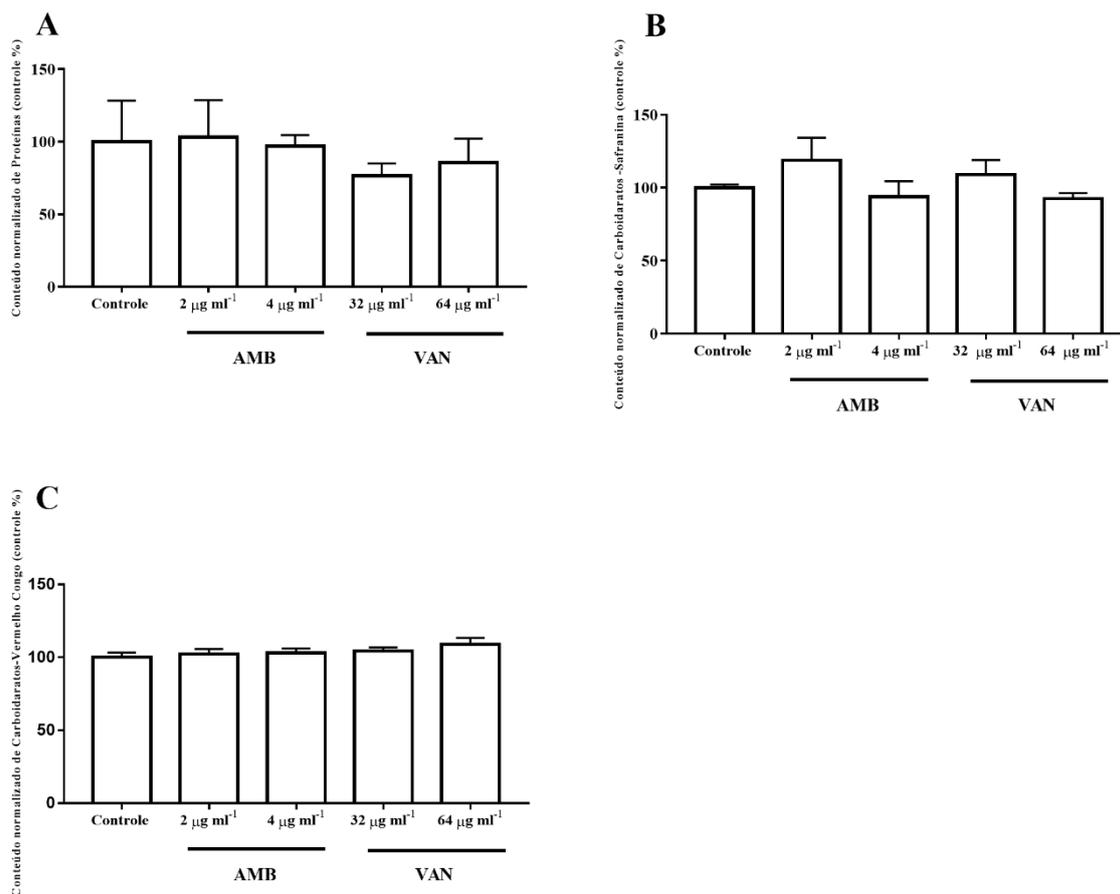
YOO, Y. J. et al. *Candida albicans* virulence factors and pathogenicity for endodontic infections. **Microorganisms**. [S.l: s.n.]. , 2020

YOUNG, T. et al. *Candida albicans* as an essential “keystone” component within polymicrobial oral biofilm models? **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–23, 2021.

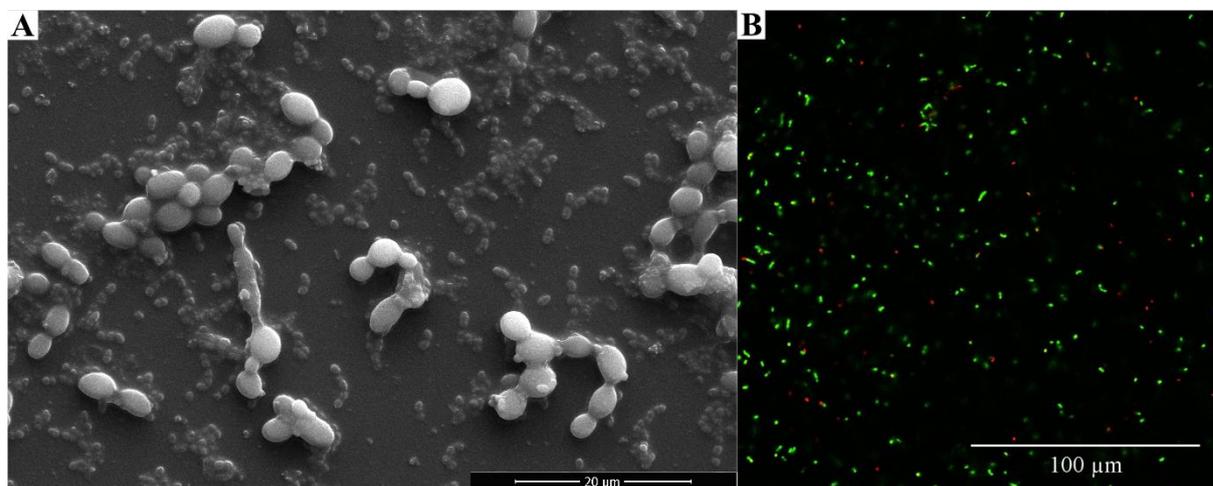
ZEHNDER, M. **Root Canal Irrigants**. **Journal of Endodontics**. [S.l.]: Elsevier. , 2006.

## APÊNDICE A

### Quantificação do conteúdo de carboidratos por Safranina e Vermelho de Congo e quantificação de proteínas por SYPRO RUBY.



**Figura Apêndice A.** Conteúdo normalizado de carboidratos (A, safranina; B, vermelho congo) e proteínas (C) pelo controle do biofilme duo-espécie após tratamento com anfotericina B (AMB) e vancomicina (VAN). Biofilmes duo-espécie foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 35 °C, por 48 h, sem agitação. Depois desse período, biofilmes foram tratados com AMB ou VAN e então avaliados em seu conteúdo de carboidratos e proteínas. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com o controle. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de conteúdo de quitina.

**APÊNDICE B****Imagens de Microscopia Eletrônica de varredura e Microscopia confocal a laser de biofilmes duo-espécie formados em caldo BHI, por 48 h, a 37 °C, em microaerofilia**

**Figura Apêndice B.** (A) Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Biofilmes duo-espécie foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 37 °C, por 48 h, sem agitação. Magnificação: 5000x; Barra: 20 µm. (B). Imagens de microscopia confocal a laser de varredura (MCLV) dos biofilmes duo-espécie. Biofilmes foram formados em proporção 1:1 dos dois inóculos microbianos em meio BHI em atmosfera de microaerofilia a 37 °C, por 48 h, sem agitação. Células viáveis estão coradas em verde, e as células mortas ou lesadas estão coradas em vermelho. Magnificação: 300x. Barra: 100 µm.

## APÊNDICE C

Artigo publicado no periódico Biofouling, em junho de 2022.

BIOFOULING  
2022, VOL. 38, NO. 4, 401–413  
<https://doi.org/10.1080/08933914.2022.204613>



*Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* dual-species biofilm:  
establishment of an *in vitro* protocol and characterization

Nicole de Mello Fallos<sup>a</sup> , Ana Lúiza Ribeiro Aguiar<sup>a</sup> , Bruno Nascimento da Silva<sup>a</sup> ,  
Marco Fábio Gadelha Rocha<sup>a</sup> , José Júlio Costa Sidrim<sup>a</sup> ,  
Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia and Rossana de Aguiar Cordeiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>b</sup>School of Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

## APÊNDICE D

Artigo publicado no periódico *Antibiotics*, em novembro de 2022



Article

## The Potential of Phenothiazines against Endodontic Pathogens: A Focus on *Enterococcus-Candida* Dual-Species Biofilm

Nicole de Mello Fiallos <sup>1</sup>, Ana Luiza Ribeiro Aguiar <sup>1</sup>, Bruno Nascimento da Silva <sup>1</sup>,  
Mariana Lara Mendes Pergentino <sup>1</sup>, Marcos Fábio Gadelha Rocha <sup>1,2</sup>, José Júlio Costa Sidrim <sup>1</sup>,  
Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia <sup>1</sup> and Rossana de Aguiar Cordeiro <sup>1,\*</sup>

**APÊNDICE E****Artigo em preparo para submissão****The effect of *Candida albicans* on *Enterococcus faecalis*' gene expression: a switch on Catabolite Catabolism Repression?**

Nicole De Mello Fiallos<sup>1</sup>, Jessica Kajfasz<sup>2</sup>, Lin Zeng<sup>2</sup>, Jacqueline Abranches<sup>2</sup>, Rossana de Aguiar Cordeiro<sup>1</sup> and Jose Abelardo Lemos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Oral Biology, University of Florida*