



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

TIAGO PEREIRA DA ROSA

**VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DO GENE *ftsZ* EM
BIOFILMES DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EXPOSTOS
AO PH ALCALINO**

**CELL VIABILITY AND *ftsZ* GENE EXPRESSION OF
ENTEROCOCCUS FAECALIS BIOFILMS EXPOSED TO
ALKALINE PH**

PIRACICABA
2017

TIAGO PEREIRA DA ROSA

**VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DO GENE *ftsZ* EM
BIOFILMES DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EXPOSTOS
AO PH ALCALINO**

**CELL VIABILITY AND *ftsZ* GENE EXPRESSION OF
ENTEROCOCCUS FAECALIS BIOFILMS EXPOSED TO
ALKALINE PH**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica, na área de Endodontia.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Clinical Dentistry, in Endodontic Area.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto
Coorientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Tiago Pereira da Rosa e orientada pelo Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

PIRACICABA
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 5626-13-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

R71v Rosa, Tiago Pereira da, 1984-
Viabilidade celular e expressão do gene *ftsZ* em biofilmes de *Enterococcus faecalis* expostos ao pH alcalino / Tiago Pereira da Rosa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Rogério de Castilho Jacinto.
Coorientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilme. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. Alcalinização. 4. Sobrevivência celular. 5. Expressão gênica. I. Jacinto, Rogério de Castilho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cell viability and *ftsZ* gene expression of *Enterococcus faecalis* biofilms exposed to alkaline pH

Palavras-chave em inglês:

Biofilms

Enterococcus faecalis

Alkalinization

Cell survival

Gene expression

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Rogério de Castilho Jacinto [Orientador]

Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

Fernanda Graziela Corrêa Signoretti

Alexandre Augusto Zaia

Daniel Rodrigo Herrera Morante

Data de defesa: 10-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 10 de Fevereiro de 2017, considerou o candidato TIAGO PEREIRA DA ROSA aprovado.

PROF. DR. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO

PROF. DR. EMMANUEL JOÃO NOGUEIRA LEAL DA SILVA

PROF^ª. DR^ª. FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

PROF. DR. DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória

Aos meus pais **Pedro Bittencourt da Rosa e Arlete Pereira da Rosa,**

Incontáveis foram as vezes que meu cansaço e preocupação foram compartilhados por vocês, procurando amenizar minha ansiedade, mantendo-me firme diante dos obstáculos, em uma união que sempre me incentiva a prosseguir. Fui criado em um lar com muito amor, por isso, ao ver a louca realidade em que vivemos hoje compreendo cada vez mais o significado do seu carinho e dedicação em minha formação. Obrigado por sua dedicação, apoio e por me ensinar valores como honestidade, perseverança, responsabilidade, humildade, respeito e tolerância. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim. Eu tenho muito orgulho de ser seu filho e muita admiração pelos pais que tenho. Obrigado por tudo. Amo muito vocês!

Meus pais amados, dedico esta conquista a vocês!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP)**,

Nas pessoas do diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques e do diretor associado Prof. Dr. Francisco Haiter Neto. Da Prof^a. Dr^a. Cinthia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação e da Prof^a. Dr^a. Karina Gonzales Silverio Ruiz, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao amigo e orientador **Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto**,

Serei sempre grato pela grande oportunidade de aprendizado, pelos ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e ajudas nas tomadas de decisão. Obrigado por abrir portas que me possibilitaram ter um enorme ganho profissional e pessoal durante todo o Mestrado e Doutorado. Obrigado por sua amizade, dedicação, respeito e confiança.

À minha querida co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**,

Pelo carinho, atenção, apoio, confiança, por seus ensinamentos e pelas oportunidades. Obrigado pelas conversas e conselhos, a senhora é para mim um grande exemplo de dinamismo e dedicação ao trabalho. Tenho grande carinho pela Sra. e ótimas lembranças.

Aos professores da disciplina de **Endodontia da FOP/UNICAMP**,

Prof^a. Dr^a. Adriana de Jesus Soares, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho (in memoriam) e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida, conhecer e conviver com cada um de vocês foi um privilégio. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal e profissional. Obrigado pelo carinho!

Aos professores examinadores da **banca de qualificação**,

Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida, Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp, Prof^ª. Dr^ª. Thais Mageste Duque e a suplente Prof^ª. Dr^ª. Adriana de Jesus Soares. Agradeço por aceitarem tão prontamente o convite para participar da banca e por suas colaborações para este trabalho.

Aos professores examinadores da **banca de defesa**,

Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Prof. Dr. Daniel Rodrigo Herrera Morante, Profa. Dra. Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto e aos suplentes Prof^ª. Dr^ª. Adriana de Jesus Soares, Prof. Dr. Carlos Augusto Pantoja, Prof^ª. Dr^ª. Thais Mageste Duque. Agradeço por aceitarem tão prontamente o convite para participar da banca e por suas colaborações para este trabalho.

Aos **colegas e amigos da FOP**,

Alexandre Freire, Amanda Falcão, Ana Carolina Pimentel, Ana Mascarenhas, Andrea Cardoso Pereira, Andrea Araújo, Augusto Rodrigues Lima, Aniele Lacerda, Angelina Bergamin, Ariane Marinho, Bruno Bueno Silva, Camila Lima, Carlos Augusto Pantoja, Carolina Santos, Cláudia Suzuki, Cimara Barroso, Conrado Caetano, Eduardo Sousa Jr., Elilton Pinheiro Jr., Eloa Pereira, Érika Clavijo, Erika Condo, Erika Harth, Estela Winocur, Ezilmara Rolim de Sousa, Daniel Herrera, Daniela Miyagaki, Day Oliveira, Darklilson Santos, Diogo H. Silva, Diego Nóbrega, Emmanuel João da Silva, Fábio Fabretti, Fabrício Rutz, Felipe Anacleto, Fernanda Lins, Fernanda Signoretti, Fernando Rigolin, Flávia Saavedra, Francisco Montagner, Frederico Martinho, Frederico Manhães, Frederico Sampaio, Giselle Abi Rached, Giancarlo De la Torre, Jaqueline Lazzari, Jefferson Marion, Jonny Burga Sanchez, Juliana Nagata, Karine Schell, Kat Yusk, Karina Moraes, Laura Ramirez, Leonardo Peroni, Letícia Gonçalves, Letícia Nóbrega, Livia Foster, Luale Leão, Lucas Alves Moura, Luiz Eduardo Ferreira, Maira do Prado, Manuela Rocha, Marcos Endo, Marcos Frozoni, Maria Raquel Monteiro, Mario Zuolo, Marisol Mayco, Marianne Carvalho, Marlos Ribeiro, Maximiana Maliska, Milton Cougo, Núbia Pini, Pedro Ricomini, Plínio Senna, Polliane Carvalho, Priscila Peyneau, Rafaela Chapola, Rafael Orro, Raquel Werczler, Regiane Amaral, Rodrigo Vasconcellos, Rosa L. Abuhadba Moscoso, Sibebe Aquino, Tereza Pedroza, Thais Accorsi, Thais Mageste Duque, Thais Harder, Thiago Farias, Thiago Gamba, Tiago Vianna, Veber Bomfim, Victor Muñoz, Victor Toral, Wilfredo González, Yuri Nejaim, Zarina das Neves, entre outros, por compartilhar de sua alegria, companheirismo, amizade e experiências.

Aos funcionários da FOP/UNICAMP,

Ana Cristina Godoy, Geovania Almeida, Ana Helídia, Ana Paula e Jéssica, Adriano Luis, Maicon Passini, Eliane Narvaes, Paulo Alcarde, Eliane Melo, pelo carinho, amizade, por sua ajuda, conselhos e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

Pelo suporte financeiro – Processo no. 5626-13-7 e no. 10342-12-5.
À School of Dentistry da Oregon Health & Science University (OHSU) – Portland OR,

Nas pessoas do diretor Prof. Dr. Phillip T. Marucha e diretor associado à pesquisa Prof. Dr. David Morton.

À minha co-orientadora no exterior Prof^a. Dr^a. Christine M. Sedgley,

Orientadora e ser humano admirável, mesmo diante de problemas pessoais enormes, se dispôs ao máximo para atender minhas dúvidas e contribuir para que meu período de estágio no exterior tivesse um bom aproveitamento.

À Prof^a. Dr^a. Kirsten J. Lampi e ao Prof. Dr. Michael V. Danilchik,

Exímios pesquisadores, exemplos de humildade e generosidade. “Mike” dedicou parte do seu tempo à me orientar no uso do Confocal. “Dr. L”, me “adotou” nos momentos de ausência da Dra. Sedgley, me fez sentir verdadeiramente parte da equipe. Agradeço por disponibilizar seu laboratório e equipamentos para a condução dos experimentos.

Aos companheiros de laboratório e corredores da OHSU,

Guy Simmons, Melissa Andrew, Jackson Wongshofsky, Hannah Powell, Selina Garces, McWilbes Mibya, Gedalias Martim e sua esposa Jaqueline Martim, Jason Kung, Ataís Bacchi, Adam Dobson, Prof^a. Dr^a. Carmem Pfeifer sem sua amizade e parceria não seria possível realizar esse trabalho.

À **Portlandia**,

April Grisetti, Arkady Brown, Adrienne Yorker, James Lee Bunch, Sandra Bunch, Corey Bunch, Suzi Bunch, Jonathan Bunch, Stephen Lamar Caston, Erin Monahan, Joshua Logue, Kevin Strom, Zach Job, Adam Snyder, Ralph Daub, Robert Logue, Dan Gaston, Mistie Dymond, Jesse Sugar Moore, Cory Knoblauch, Byron Etta, Nora Jamerson, Tyler Nelson, Zach Markiss, Kate Markiss, Dan Zinder, Kris Torgles, Melissa Gorris, Matthew Richard, Nilesh Bahir, Jacob Hill, Jeremy LaGoo, Gina Burgess, Brian Lawrence, algumas das pessoas fantásticas que encontrei nessa cidade maravilhosa. Com vocês aprendi, dei boas risadas, escalei, viajei, tive as mais diversas experiências que me fizeram sentir em casa.

Aos queridos **Lane Poncy** e **Doug Poncy** (in memoriam),

Meus avós / pais / amigos em Portland, foi muito bom dividir esse ano maravilhoso com vocês. Aprendi muito com nossas conversas. Para Lane não tem tempo ruim, sempre com sorriso no rosto e uma risada contagiante. Voltar para casa e encontrá-la assistindo seriado ou indignada por estar “apanhando” para suas amigas no scrabble não tem preço, saudades!

À **Kickass Roadtrip**,

Eric Koczab, Justin Weihs, Benny Gill, Michael Brewer. Proporcionaram uma das melhores viagens da minha vida, conhecendo lugares que turista algum imaginou visitar e realizando proezas que jamais pensei em fazer, tudo em ótima companhia.

Aos amigos e professores do curso de **Especialização em Endodontia da ABO/SC**,

Prof. Dr. Bráulio Pasternak Jr.; Prof. Dr. César Augusto Pereira Oliveira; Prof. Guy Martins Pereira por sua amizade, seus ensinamentos, incentivo, auxílio e parceria que permanece até hoje.

Prof. Dr^a. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, minha eterna orientadora, por seu exemplo de dedicação ao desenvolvimento de pesquisas sérias e de qualidade, mesmo diante das adversidades.

Tenho profunda admiração e respeito pelo trabalho que desenvolvem em Florianópolis.

Aos professores e amigos da **Faculdade de Odontologia Avantis** – Balneário Camboriú SC,

Prof. Dr. Ricardo Ferreira, Profª. Larissa Fernanda Pinto, Prof. Gustavo da Luz Vieira, Profa. Dra. Márcia Gonçalves Lucena, Prof. Oberdam Ferreira.

Ao **38º Batalhão de Infantaria do Exército Brasileiro**, Vila Velha – ES,

Nas pessoas do Cel Hiroshi, comandante do batalhão; Cel Nailson, subcomandante; Maj Isabel Delgado, chefe do Posto Médico; Cap Pollyana Darós, chefe do gabinete odontológico; Cap Carolina, 1º Ten Silva Rodrigues, 1º Ten Luciana, 1º Ten Ana Freixinho, 2º Ten Bertha, 2º Ten Marques, 2º Ten Sarah e 2º Ten Viduani.

Aos meus **familiares**,

Meus avós (in memoriam), tios e primos (que são muitos!)

Meus pais Arlete e Pedro,

Meu irmão Maurício, minha cunhada Tatiana e a minha sobrinha/afilhada Luíza (linda do dindo!),

Meu irmão Daniel, minha cunhada Mariana e ao pequeno Dante que ainda nem nasceu mas já é muito amado.

Amo todos, vocês são tudo pra mim! Saudades sempre!

À minha namorada **Liana Ferreira**,

Ela que tem a difícil missão de me aturar todos os dias!

Obrigado por cruzar minha vida, seus sorrisos alteram minha percepção de tempo e fazem com que os anos passem voando!

Agradeço também pelo carinho que recebo da sua família: Dona Nilzinha, Seu Zé, Guilherme e Andrea, Guilhermino e Luíza. Sem esquecer de todos os tios e primos que tenho dificuldade de memorizar os nomes!

Àqueles que esqueci de citar nesses agradecimentos,

Não fiquem chateados, seu amigo aqui tem dificuldade até em lembrar o que comeu ontem! Beijos e abraços a todos!

Por fim, agradeço as pessoas que, de uma forma ou de outra, colaboraram em minha formação e crescimento pessoal e profissional.



Put a bird on it!

RESUMO

A formação de biofilme *in vitro* pode ser influenciada pelas características da cepa, tempo de incubação e disponibilidade de nutrientes como a glicose, que regula a produção de biofilme de diversas espécies, incluindo *Enterococcus faecalis* - espécie bacteriana mais frequentemente relacionada ao insucesso endodôntico. A capacidade de penetrar em túbulos dentinários e formar biofilme são fundamentais em sua resistência ao pH elevado de agentes antimicrobianos utilizados no tratamento endodôntico. Mudanças na taxa de crescimento, na expressão gênica e fenotípica são características dos biofilmes. Este estudo *in vitro* teve o objetivo de avaliar e comparar a formação de biofilmes de três cepas de *E. faecalis* em diferentes concentrações de glicose; e avaliar a viabilidade celular e a expressão do gene de divisão celular, *ftsZ*, de biofilmes maduros de *E. faecalis* em desafio alcalino. **Métodos:** A formação de biofilme pelas cepas ATCC 29212, GS12 e JH2-2 em meio TSB suplementado por 0%, 0.5%, 1% e 2% de glicose foi avaliada pela mensuração das densidades óticas (OD) em cristal violeta ao longo de 7 dias. Na sequência, biofilmes maduros de *E. faecalis* GS12 foram incubados por 7 dias em meio TSB (+2% glicose) ajustado ao pH 7, 10, 11, e 12. No decorrer dess período, a viabilidade celular e a expressão do gene *ftsZ* foram analisadas por microscopia confocal e qPCR. **Resultados:** As cepas apresentaram capacidade de formação de biofilme distintas ($p < 0.05$). *E. faecalis* ATCC 29212 e JH2-2 não formaram biofilme em TSB sem adição de glicose ($OD_{570} < 0,3$). *E. faecalis* GS12 demonstrou maior biomassa em todos os momentos e sob todas as concentrações de glicose ($p < 0.001$). Após 24 h em meio alcalino, todos os grupos experimentais apresentaram uma redução de volume ($p < 0.05$). Em pH 7, a maioria das células permaneceram viáveis durante todo o período experimental ($90\% \pm 0.06\%$). Em pH 10, não houve diferença na proporção de células vivas/mortas no 5º dia, no 7º dia poucas células permaneceram viáveis ($p < 0.05$). Em pH 11 e 12, o volume dos biofilmes foi majoritariamente composto por células mortas em qualquer momento da análise. A expressão do gene *ftsZ* permaneceu inalterada durante todo o período experimental nas amostras de biofilmes em pH 7 e pH 10. Biofilmes em pH 11 e pH 12 não produziram amplicons. **Conclusão:** A formação de biofilme de *E. faecalis in vitro* é dependente tanto da cepa quanto da concentração de glicose presente no meio. *E. faecalis*, GS12 exibiu maior habilidade em formar biofilme. *E.*

faecalis ATCC 29212 e JH2-2 demonstraram uma capacidade limitada de produzir biofilme durante 7 dias. O ambiente alcalino afeta a estrutura e a viabilidade celular do biofilme maduro de *E. faecalis* de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Níveis de transcritos do gene *ftsZ* em biofilmes maduros de *E. faecalis* permanecem inalterados ao longo de 7 dias em pH 7 e pH 10.

Palavras-chaves: *Biofilmes, Enterococcus faecalis, glicose, aumento de pH, viabilidade celular, expressão gênica, divisão celular.*

ABSTRACT

Biofilm formation *in vitro* is likely influenced by factors that include the intrinsic characteristics of the strain, the incubation period and nutrient availability such as glucose that regulates biofilm production among many species including *Enterococcus faecalis* – bacterial species most frequently related to endodontic failure. The ability to penetrate into dentinal tubules and form biofilms are essential features to withstand the high pH of antimicrobial agents used during endodontic treatment. Changes in growth rate, gene expression and phenotype are usual features in biofilm life style. This *in vitro* study aimed to evaluate and compare the biofilm growth of three *E. faecalis* strains in different glucose concentrations; and to analyzed cell survival and expression of *ftsZ*, a cell division gene, in mature *E. faecalis* biofilms in alkaline stress.

Methods: The biofilm growth of *E. faecalis* ATCC 29212, GS12 and JH2-2 was assessed with crystal violet assay by measuring optical densities during 7 days of incubation in TSB medium supplemented with 0% , 0.5%, 1% and 2% glucose. Afterwards, mature *E. faecalis* GS12 biofilms were incubated for 7 days in TSB (+2% glucose) and adjusted to pH 7, 10, 11, and 12. Along this period, cell viability and *ftsZ* gene expression were analyzed by confocal microscopy and qPCR.

Results: The strains had significantly different biofilm-forming ability ($p < 0.05$). *E. faecalis* ATCC 29212 and JH2-2 did not form biofilm in TSB medium without additional glucose supplementation ($OD_{570} < 0,3$). *E. faecalis* GS12 presented the greatest biomass at all time points and under any glucose concentration ($p < 0.001$). In the first 24 h of alkaline challenge, all experimental groups presented a significant reduction on biofilm volume ($p < 0.05$). At pH 7, most of biofilm cells remained viable throughout the experimental period ($90\% \pm 0.06\%$). At pH 10, no difference in proportion of live/dead cells was observed by the 5th day, by the 7th day there were few remaining live cells ($p < .05$). At pH 11 and pH 12, most biovolume was composed of dead cells at any time point. The expression of *ftsZ* gene remained unaltered throughout the experimental period in biofilm samples exposed to pH 7 and pH 10. Biofilms exposure to pH 12 and PH 11 produced no amplicon.

Conclusion: *E. faecalis* biofilm formation *in vitro* is strain- and glucose-dependent. *E. faecalis* GS12 presented the greatest biofilm formation ability among the analyzed strains. *E. faecalis* ATCC 29212 and JH2-2 have a limited capacity to form biofilm over 7 days of incubation. Alkaline environment affected

mature *E. faecalis* biofilm structure and cell viability in a concentration- and time-dependent manner. Transcript levels of *ftsZ* gene remained unaltered in mature *E. faecalis* biofilms at pH 7 and pH 10 over 7 days.

Key Words: *Biofilms, Enterococcus faecalis, glucose, alkalization, cell survival, gene expression, cell division.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 ARTIGOS	23
2.1 Artigo - Strain variation in <i>Enterococcus faecalis</i> biofilm formation when grown in different glucose concentrations.....	23
2.2 Artigo – Cell viability and <i>ftsZ</i> gene expression of <i>Enterococcus faecalis</i> biofilms exposed to alkaline pH.	33
3 DISCUSSÃO	48
4 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS*	55
APÊNDICE 1 – Detalhamento da metodologia	62
ANEXO 1 – Documento para fins de comprovação de submissão do artigo ...	69

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico em canais radiculares contaminados é eliminar a infecção do sistema de canais radiculares e prevenir sua recontaminação por meio da obturação. Deste modo, o tratamento endodôntico fornece condições favoráveis para a manutenção ou o reparo dos tecidos periapicais (Kakehashi et al., 1965; Sundqvist et al., 1998; Stuart et al., 2006). Contudo, mesmo quando obedecidos criteriosamente os padrões técnicos de tratamento, estima-se que a completa eliminação dos microrganismos que infectam o sistema de canais radiculares é raramente alcançada pelo preparo químico-mecânico e medicação intracanal (Bystrom et al., 1985; Siqueira e Rôças, 2008).

Estudos sobre a taxa de sucesso em tratamentos e retratamentos endodônticos não cirúrgicos exibem valores que variam de 31% a 100% de sucesso (Ng et al., 2007; Imura et al. 2007; Ng et al., 2008a; Ng et al., 2008b). Segundo os estudos incluídos nas revisões sistemáticas realizadas por Ng et al. (2007; 2008b), entre 68% e 85% dos tratamentos de infecções endodônticas primárias obtiveram total reparo após um período de 1 ano. Números semelhantes foram observados em retratamentos, cujo sucesso variou de 70% a 86% dos casos (Ng et al., 2008a). Dentre as principais causas relacionadas ao insucesso, destacam-se as contaminações secundárias via infiltrações coronárias e a permanência de microrganismos no interior do canal, mesmo após o tratamento (Ray e Trope, 1995; Siqueira, 2001). Isso reforça a dificuldade em alcançar a completa desinfecção do sistema de canais radiculares.

Nesse sentido, a habilidade bacteriana de se organizar em biofilme é de grande interesse terapêutico em endodontia. Sabe-se que bactérias planctônicas presentes no canal principal são mais facilmente acessadas e eliminadas pela ação dos instrumentos e substâncias químicas auxiliares durante o tratamento endodôntico. Por outro lado, aquelas organizadas em biofilme, aderidas às paredes radiculares em regiões de istmos, ramificações ou no interior de túbulos dentinários são definitivamente mais difíceis de serem alcançadas (Ricucci e Siqueira, 2010). A literatura demonstra que, mesmo nos canais principais, biofilmes podem permanecer intocados pelos instrumentos especialmente em casos de canais irregulares, achatados ou com secção transversal ovalada (Siqueira et al., 1997; Paqué et al., 2010).

Biofilmes, por definição, são comunidades microbianas sésseis compostas por células firmemente aderidas a um substrato, uma interface ou umas às outras; incorporadas a uma matriz extracelular polimérica produzida por elas mesmas e caracterizada por alterações da taxa de crescimento e transcrição gênica (Donlan e Costerton, 2002). Este estilo de vida é predominante entre procariotas e um padrão entre algumas espécies bacterianas (Donlan e Costerton, 2002; Jefferson, 2004). Embora sejam geralmente formados por comunidades microbianas mistas, os biofilmes podem também ser constituídos por uma única espécie (Stoodley, et al., 2002). De acordo com o “*National Institutes of Health*” (NIH), os biofilmes microbianos estão envolvidos em cerca de 80% das infecções humanas (Joo e Otto, 2012). As condições em que esses biofilmes são formados no interior dos canais radiculares ainda não são bem compreendidas (Svensater e Bergenholtz, 2004), contudo, infecções primárias, secundárias e persistentes abrigam uma alta prevalência de biofilme bacteriano (Ricucci e Siqueira, 2010).

Ao avaliar histologicamente o segmento apical de dentes com canais radiculares tratados e não-tratados endodonticamente, com expressão radiográfica de periodontite apical, Ricucci e Siqueira (2010) observaram a presença de biofilmes intrarradulares em 77% dos casos (não-tratados: 80%; tratados: 74%). Esses números variaram com o tamanho ($\leq 5\text{mm}$: 62%; $>5\text{mm}$: 82%; $\geq 10\text{mm}$: 100%) e o tipo de lesão (Cistos: 95%; Abscessos: 85%; Granulomas: 69,5%). Além dos canais principais, os autores puderam observar biofilmes cobrindo ramificações, istmos e penetrando túbulos dentinários. Em 6% dos casos, biofilmes foram encontrados também na superfície extrarradicular associados, geralmente, a infecção no interior do canal radicular de dentes sintomáticos (Ricucci e Siqueira, 2010).

Existem evidências consideráveis que as propriedades fisiológicas das bactérias são alteradas quando em biofilme. A adesão a uma superfície engatilha alterações na expressão de um grande número de genes e seus fenótipos. Dessa forma, os microrganismos assumem um maior potencial patogênico quando comparados àqueles em estado planctônico. Nesse sentido, os mecanismos de defesa do hospedeiro e os tratamentos antimicrobianos químicos e mecânicos têm uma tarefa mais difícil ao lidar com os microrganismos nessa forma de desenvolvimento (Svensater e Bergenholtz, 2004).

O arranjo em comunidade proporciona vantagens na competição entre os microrganismos: 1) aumentando a diversidade e eficiência metabólica, o que permite a degradação de grandes complexos moleculares, 2) reforçando a proteção diante das defesas do hospedeiro, de agentes antimicrobianos e sob influências adversas do meio e, 3) provocando um aumento na patogenicidade (Marsh, 2005). Bactérias crescendo em biofilme possuem resistência adicional a agentes antimicrobianos. A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) de antibióticos podem atingir valores 100 a 1000 vezes maiores em um biofilme do que em seu correspondente planctônico (Ceri et al., 1999; Haussler e Fuqua, 2013).

Enterococcus faecalis é um habitante comum do trato gastrointestinal e geniturinário relacionado com a maioria das infecções enterocócicas (Tannock e Cook, 2002). A diversidade entre as cepas de *E. faecalis* permite que essa espécie colonize uma variedade de locais no corpo humano, em outros animais e em nichos ambientais (Fisher e Phillips, 2009). Em endodontia, *E. faecalis* é descrito como a espécie mais frequentemente encontrada em canais radiculares de casos de insucesso no tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003; Siqueira e Rôças, 2004; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008). Em estudos envolvendo métodos de cultura, sua prevalência no insucesso endodôntico alcança até 52% dos casos (Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2006). Esse número pode ser ainda maior quando utilizados métodos moleculares, mais sensíveis à detecção (Siqueira e Rôças, 2004; Johnson et al., 2006; Sedgley et al., 2006; Gomes et al., 2008).

Siqueira e Roças (2004) ao investigar a composição microbiana de 22 casos de insucesso no tratamento endodôntico pelo método molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) observaram a presença de *E. faecalis* em 77% dos casos. Número semelhante foi encontrado por Gomes et al. (2008) ao avaliar 45 casos de insucesso pelo mesmo método (77,8%). Sedgley (2006) observou uma prevalência ainda maior (89,6%) ao avaliar esses casos de insucesso em “*Real Time - quantitative PCR*”.

E. faecalis conta com a capacidade de penetrar em túbulos dentinários (Orstavik e Haapasalo, 1990) e se aderir as paredes radiculares formando biofilme (Mohamed e Huang, 2007), atributos que podem lhe conferir vantagens ecológicas em diversas situações. Este microrganismo é também capaz de resistir a condições ambientais adversas como às promovidas pelo elevado pH do hidróxido de cálcio

(Flahaut et al., 1997; Ran et al., 2013), substância mais utilizada como medicação intracanal em endodontia. Flahaut et al. (1997) observaram que quando submetido a um período de adaptação de 30 min. em pH 10,5, *E. faecalis* foi capaz de tolerar pH maiores que 11. Ran et al. (2013) ao avaliarem a formação de biofilmes de *E. faecalis* em ambiente alcalino também observaram a tolerância desse microrganismo ao pH 11. Sundqvist et al. (1998) mostram que *E. faecalis* pode ser facilmente eliminado quando em pequeno número, entretanto, uma vez estabelecido no sistema de canais radiculares se torna um microrganismo de difícil erradicação. Essas características associadas a capacidade de se desenvolver em inúmeras condições laboratoriais (Ran et al., 2013) fez com que *E. faecalis* se tornasse o principal microrganismo utilizado para testar irrigantes, medicamentos e soluções antissépticas em estudos *ex vivo* e *in vitro* em endodontia (Chávez de Paz, 2007).

A grande maioria desses estudos se concentram no uso da cepa referência, *E. faecalis* ATCC 29212 (George, et al., 2005; Baca, et al., 2012; Guerreiro-Tanomaru, et al., 2013). Contudo, sabe-se a capacidade de formação de biofilme pode variar entre cepas de uma mesma espécie devido as suas características intrínsecas (Mohamed et al., 2004; Duggan e Sedgley, 2007; Wang et al., 2011). Mohamed et al. (2004) avaliaram 79 cepas clínicas de *E. faecalis* de origem em endocardites. Embora todas demonstraram ser capazes de formar biofilme, 39% delas apresentaram um grande potencial de formação, 52% revelaram um potencial moderado enquanto 9% tiveram uma limitada formação de biofilme. Duggan e Sedgley (2007) ao investigar a capacidade de formação de biofilme entre cepas clínicas de origem na cavidade oral e em canais radiculares também observaram diferentes potenciais de formação de biofilme. Em seu estudo, 18% das cepas de origem endodôntica apresentaram grande potencial de formação de biofilme.

A formação de biofilme *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores como as características intrínsecas da cepa, o tipo de superfície, o tempo de incubação e a disponibilidade de nutrientes (Sandoe, et al., 2003; Mohamed, et al., 2004; Duggan, and Sedgley, 2007; Seneviratne, et al., 2013; Guerreiro-Tanomaru, et al., 2013). O metabolismo de carboidratos, como a glicose, regula a produção de biofilme de diversas bactérias, inclusive a de *E. faecalis* (Baldassarri, et al., 2001; Kristich, et al., 2004). Estudos relacionam a suplementação de glicose ao meio de cultura com o aumento na formação de biofilme (Baldassarri, et al., 2001), enquanto

outros apontam que uma disponibilidade de glicose pode inibir essa formação (Kristich, et al., 2004).

Tanto na forma planctônica como em biofilmes o desenvolvimento dos microrganismos requer divisão celular. FtsZ é uma proteína homóloga a tubulina que desempenha um papel importante na divisão celular dos procariotas (Lutkenhaus e Addinall, 1997). Esta proteína é uma das primeiras a se posicionar no local em que ocorre a divisão celular e compõe uma estrutura chamada “anel FtsZ” ou “anel Z” (Margolin, 2015). É o anel Z que define o local e o momento em que o septo para divisão celular é formado. Sua formação é decorrente de tendências intrínsecas da FtsZ de polimerizar-se e da ação de proteínas moduladoras capazes de estimular ou inibir a polimerização da FtsZ (Lutkenhaus, and Addinall, 1997).

Uma das primeiras indicações de que FtsZ desempenha um papel fundamental na divisão celular veio de estudos que envolveram o aumento da expressão do gene *ftsZ*. Este aumento produziu uma conseqüente elevação nos níveis da proteína FtsZ. Alguns estudos relatam que a expressão do gene *ftsZ* e a formação do “anel FtsZ” está sujeita a uma regulação dependente da taxa de crescimento (Garrido, et al., 1993; Joseleau-petit, et al., 1999). Outros colocam que esse fenômeno pode fazer com que a divisão ocorra nos polos celulares, formando células filhas assimétricas, com dimensões reduzidas e/ou irregulares (Ward e Lutkenhaus, 1985; Lutkenhaus e Addinall, 1997). Em um estudo realizado por Appelbe e Sedgley (2007), células planctônicas de *E. faecalis* apresentaram um aumento de 37 vezes na transcrição do gene *ftsZ* após 5 dias de exposição ao pH 10 (37°C). Ran et al. (2013) também observaram um aumento na transcrição do gene *ftsZ* (mais de 10 vezes em pH 10 e mais de 100 vezes em pH 11) ao avaliar a formação de biofilme de *E. faecalis* em pH alcalino por 24 h e 48 h. Em microscopia eletrônica de transmissão, as células sob estresse alcalino apresentavam morfologia irregular com defeitos na divisão e perda de simetria.

Não obstante, um dos preceitos da vida bacteriana planctônica de direcionar a energia proveniente dos nutrientes para reprodução pode não se aplicar a biofilmes bacterianos maduros, cuja divisão celular é menos frequente. A energia, nesses casos, é direcionada a produção da matriz extracelular, substância que as células do biofilme podem utilizar como nutriente em momentos de necessidade (Watnick e Kolter, 2000). Da mesma forma, se dividir ou não é uma resolução celular

importante, especialmente para bactérias que estão expostas a mudanças ambientais drásticas. Em condições adversas, o crescimento e a proliferação pode comprometer a integridade celular. Para este fim, as bactérias desenvolveram mecanismos sofisticados para traduzir informações ambientais em controle do ciclo celular (Jonas, 2014).

Em suma, nem todas as cepas de uma espécie se comportam de maneira similar. A formação de biofilme *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores como as características intrínsecas da cepa, o tipo de superfície, o tempo de incubação e a disponibilidade de nutrientes como a glicose, que regula a produção de biofilme de diversas bactérias, incluindo *E. faecalis*. *E. faecalis* é a espécie bacteriana mais frequentemente encontrada diante do insucesso endodôntico. Sua capacidade de penetrar em túbulos dentinários, aderir às paredes radiculares e formar biofilme são apontadas como os principais fatores responsáveis por sua resistência a condições ambientais adversas como o pH elevado de agentes antimicrobianos utilizados durante o tratamento. Este estilo de vida microbiano caracteriza-se por mudanças na taxa de crescimento e na expressão de genes e seus fenótipos. Um melhor entendimento dos meios pelos quais *E. faecalis* forma biofilme e é capaz de sobreviver à terapêutica endodôntica pode produzir fundamentos para estudos futuros e contribuir no aprimoramento de protocolos de tratamento em endodontia.

Em vista disso, o presente estudo é dividido em dois capítulos com os seguintes objetivos: Capítulo 1 - avaliar e comparar a dinâmica de formação de biofilmes da cepa referência *E. faecalis* ATCC 29212 com a cepa laboratorial *E. faecalis* JH2-2 e a cepa clínica coletada de um retratamento endodôntico *E. faecalis* GS12 em diferentes concentrações de glicose; Capítulo 2 - avaliar a viabilidade celular e a expressão do gene de divisão celular, *ftsZ*, de biofilmes maduros de *E. faecalis* em situação de estresse alcalino.

2 ARTIGOS

2.1 ARTIGO - Strain variation in *Enterococcus faecalis* biofilm formation when grown in different glucose concentrations.

**Este artigo foi submetido a revista Brazilian Oral Research (Anexo 1)*

ABSTRACT

E. faecalis is frequently recovered from the root canals of endodontically treated teeth undergoing retreatment. Investigations on the antimicrobial activity of agents for use in endodontic treatment have typically utilized *E. faecalis* ATCC 29212, a strain recovered from urine. The aim of this study was to evaluate and compare biofilm production by *E. faecalis* ATCC 29212 with a strain recovered from an endodontic retreatment case (GS12), and a laboratory strain (JH2-2) when strains were exposed to different glucose concentrations. Biofilms were grown on polystyrene in tryptic soy broth (TSB) supplemented with additional glucose (0%, 0.5%, 1% and 2%) at 37°C under aerobic conditions. After 24 h, 48 h, 72 h, 5 days and 7 days, biofilm mass was measured by using a crystal violet assay and a microtiter plate reader at an optical density of 570 nm. There was a significant difference between the three strains in their biofilm production ($p < 0.05$). *E. faecalis* GS12 produced the densest biomass at all time points and under all glucose concentrations ($p < 0.001$). Increased glucose availability was positively correlated with increased biofilm production for *E. faecalis* GS12 ($p < 0.05$). *E. faecalis* ATCC 29212 and JH2-2 did not form biofilms unless additional glucose was provided. The extent of *E. faecalis* biofilm formation *in vitro* is strain- and glucose-dependent. *E. faecalis* GS12 presented the greatest biofilm formation ability among the analyzed strains. *E. faecalis* ATCC 29212 and JH2-2 demonstrated a limited capacity to form biofilm over 7 days of incubation.

Key words: Biofilm, *Enterococcus faecalis*, glucose.

INTRODUCTION

Biofilms are sessile microbial communities composed by cells firmly attached to a substratum or an interface or to each other; embedded in a polymeric extracellular matrix produced by themselves and characterized by changes in growth rate and gene transcription.¹ They have been described as the default mode of growth for some bacterial species² and a predominant lifestyle among bacteria in nature.¹ Biofilms typically consist of a mixed bacterial community, but also can be found as a single species population.³ According to Joo and Otto,⁴ estimates for the percentage of bacterial infections in humans involving biofilms is ~65% (Centers for Disease Control) and 80% (National Institutes of Health). Untreated and treated teeth with apical periodontitis revealed a high prevalence of bacterial biofilms at the apical third, 80% and 74%, respectively.⁵

Enterococcus faecalis is a common inhabitant of the human gastrointestinal and genitourinary tract, and is related to the majority of human enterococcal infections.⁶ It is frequently recovered from the root canals of endodontically treated teeth undergoing retreatment⁷⁻¹⁰, with prevalence in canals of up to 52% and 90% in studies using culture^{8,9} and molecular^{7,10,11} methods, respectively. *E. faecalis* is capable of resisting harsh environmental conditions such as those promoted by the high pH of calcium hydroxide.¹² The species also shows the ability to penetrate into dentinal tubules,¹³ to form biofilm¹⁴ and can survive in root filled teeth for extended periods.¹⁵ Its recovery from infected root canals, coupled with an ability to readily grow under many laboratory conditions¹⁶ has resulted in *E. faecalis*, in particular the readily available strain ATCC 29212, becoming a frequent species for testing the antimicrobial efficacy of different irrigants, medicaments, and antiseptic solutions for *in vitro* endodontic studies.¹⁷⁻²⁰

In fact, not all strains of a species behave similarly^{21,22} and biofilm formation *in vitro* is likely influenced by factors that include the intrinsic characteristics of the strain,²¹⁻²³ the type of surface,²⁰ the incubation period and nutrient availability.^{24,25} Carbohydrate metabolism regulates biofilm production among many bacteria including *E. faecalis*.^{26,27} Some studies have shown that glucose supplementation enhances *E. faecalis* biofilm formation,²⁷ as others have related the glucose availability to a inhibition of biofilm production.²⁶ A better understanding of the means by which *E. faecalis* develop biofilms may provide foundation for further studies and contribute to

improve endodontic treatment protocols. Thus, the aim of this *in vitro* study was to evaluate and compare biofilm production among *E. faecalis* strains (ATCC 29212, GS12, and JH2-2) grown in different glucose concentrations.

MATERIALS AND METHODS

E. faecalis strains ATCC 29212, JH2-2,²⁸ GS12²⁹ were taken from -80°C stocks and plated onto Tryptic Soy Broth (TSB, Becton Dickinson and Co, Sparks, MD, USA) supplemented with 1.5% agar and incubated aerobically at 37°C for 24 h.

Biofilm Assay

After overnight culture, isolated bacterial colonies were suspended in TSB and adjusted to a concentration of 3.0×10^8 CFU/mL using a calibrated spectrophotometer (Spectronic 20D, Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA) at 600 nm wavelength. A 20 μ L aliquot of each standardized bacterial suspension was placed into individual wells of flat-bottomed polystyrene 96-well microtiter plates (Corning Costar, Tewksbury, MA, USA). To each inoculated well was added 180 μ L of TSB supplemented with either 0%, 0.5%, 1% or 2% glucose (EMD Millipore, Darmstadt, Germany). Wells containing 200 μ L of sterile TSB were used as negative growth controls. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions. The medium was completely renewed every 24 h. At time points 24 h, 48 h, 72 h, 5 days and 7 days the optical density (OD) was measured using a crystal violet (CV) assay.²⁵

Quantification of *E. faecalis* biofilms using crystal violet (CV) assay.

TSB was drawn off by pipetting and biofilm in each well was washed with 200 μ L of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2, Corning, New York, USA). Biofilm was fixed with 200 μ L of 1% paraformaldehyde with 1mM CaCl₂ in PBS for 15 min, rinsed with PBS and stained with 200 μ L of 0.01% CV for 15 min. Wells were rinsed with PBS and bound CV was dissolved with 200 μ L of ethanol-acetone solution (80:20, vol/vol) for 5 min. The OD₅₇₀ of the released CV was measured using a microtiter plate reader (Bio-Tek - Synergy HT, Winooski, VT, USA). All experiments were performed in quadruplicate on three different occasions.

Statistical Analysis

The effects of strain type and glucose concentration were evaluated by using GraphPad Prism software for Macintosh (Version 6.0; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Normal distribution of data was verified by the D'Agostino and Pearson normality test. Two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test of mean OD₅₇₀ readings were used to analyze the effects of strain and glucose supplementation. Significance was set at 5%.

RESULTS

OD₅₇₀ values (mean ± SD) ranged from 0.131 ± 0.017 to 2.689 ± 0.190 (Figure 1). There was a significant difference between the three strains in their biofilm production (p<0.05). For *E. faecalis* ATCC 29212 OD₅₇₀ readings ranged from 0.180 ± 0,029 to 0.678 ± 0,156, with maximum biofilm at 72 h in 1% glucose. For *E. faecalis* JH2-2 OD₅₇₀ readings ranged from 0.131 ± 0,017 to 0.820 ± 0,223, with maximum biofilm at 7 days in 2% glucose. For *E. faecalis* GS12 OD₅₇₀ readings ranged from 0.683 ± 0,162 to 2.689 ± 0,190 with maximum biofilm at 72 h in 2% glucose. No biofilm was detected in negative growth control wells.

E. faecalis GS12 produced the densest biomass at all time points and under all glucose concentrations (p<0.001). Increased glucose availability was positively correlated with increased biofilm production for *E. faecalis* GS12 (p<0.05). *E. faecalis* ATCC 29212 and JH2-2 did not form biofilm when incubated in TSB medium without additional glucose supplementation (OD₅₇₀ = 0.202 ± 0.035 and 0.167 ± 0.038, respectively).

DISCUSSION

In vitro studies have shown the capacity for *E. faecalis* under varying experimental conditions to successfully form biofilms on various surfaces.^{19,20,25,30} In this study, the biofilm formation of an *E. faecalis* reference strain (ATCC 29212) was compared to a laboratory strain JH2-2 (a fusidic acid and rifampin resistant mutant of JH2)²⁸ and a clinical strain recovered from an endodontic retreatment case (GS12).²⁹ Biofilm formation was evaluated by growth over 7 days of incubation in TSB medium with addition of glucose in different concentrations (0%, 0.5%, 1% and 2%).

In accordance with the classification of Mohamed et al.,²² who evaluated *E. faecalis* endocarditis strains, only strains with OD₅₇₀ readings greater than 0.5 after 24 h incubation would be described as biofilm formers – weak (<1), medium (≤ 2), or strong (>2) biofilm formers. By using these parameters, only *E. faecalis* GS12 could be categorized as a biofilm former (OD₅₇₀ = 0.683 \pm 0.162). GS12 presented the densest biomass among the analyzed strains at all time points and under any glucose concentration tested (p<0.001).

E. faecalis ATCC 29212 and JH2-2 did not form biofilm unless additional glucose was provided. It should be noted that, although TSB medium contains glucose (0.25%), this concentration was insufficient to support even “weak” biofilm formation over 7 days of incubation.²² *E. faecalis* ATCC 29212 is a urine strain used in many investigations testing endodontic products against planktonic bacteria and biofilms.^{18–20} A poor structured biofilm development was also reported by Guerreiro-Tanomaru et al.²⁰ particularly, during the first few days of incubation. Although ATCC 29212 presented greater biomass growth in supplemented media, the maximum OD₅₇₀ mean value achieved was only 0.678 \pm 0,156. *E. faecalis* JH2-2 showed an increase in biomass (>0.5) only after 7 days of incubation in supplemented media (maximum OD₅₇₀ 0.820 \pm 0.223; TSB+2% Glucose). The limited capacity of JH2-2 to form biofilm has also been observed by Duggan and Sedgley (OD₅₇₀ < 0.2).²¹

The results of this study support others that showed that not all strains of a species behave similarly.^{21–23} The distinct capacity to form biofilm might be explained by virulence traits identified in some of the strains.^{22,29,31} Surface proteins such as aggregation substance (Asa), endocarditis antigen (EfaA), collagen-binding antigen (Ace) and enterococcal surface protein (Esp) were associated with cell adhesion and biofilm formation.^{29,32–34} A positive correlation between biofilm production and the presence of GelE and its regulatory operon (*fsr*) was also reported.^{35,36} *E. faecalis* ATCC 29212 is positive for the genes *gelE*, *asa*, *ace*, *efaA* and negative for *esp* and the operon *fsr*.³¹ *E. faecalis* GS12 is a *gelE*, *fsr*, *esp*, *asa*, *ace* and *efaA* positive strain²⁹ and *E. faecalis* JH2-2, on the other hand, is negative for *esp* and *fsr*.³⁷

Steps leading to the organization of biofilm structure and the mechanisms behind the influence of glucose supplementation in biofilm growth are still unclear. Studies have reported that glucose may induce the synthesis of virulence traits such as *Esp*, which promotes the formation of biofilm.^{33,34} In contrast with Sandoe et al.,²⁴

who observed thicker *E. faecalis* biofilm formation when grown under low nutrient (saline) versus nutrient-rich Brain-Heart Infusion (BHI) medium (0.2% glucose) conditions, the present study found that TSB (0.25% glucose) supplemented with additional glucose enhanced biofilm formation ($p < 0.05$). Moreover the increased biofilm biomass was glucose concentration-dependent. The lowest biomass values of each strain were observed when grown in medium without glucose supplementation. Similar findings were reported by Seneviratne et al.,²⁵ who observed that the addition of 2% glucose enhanced biofilm formation.

At 72 h incubation, *E. faecalis* GS12 biofilm growing in TSB with the addition of 2% glucose presented the maximum OD₅₇₀ mean value observed in this study (2.689 ± 0.190). At this point, in groups with glucose added, *E. faecalis* GS12 and ATCC 29212 biofilm growth reached a stationary phase followed by a significant biomass decrease ($p < 0.05$). Similar behavior was also observed by Seneviratne et al.²⁵

Studies evaluating antimicrobial activity of substances in endodontics frequently use the strain *E. faecalis* ATCC 29212 with varying glucose concentrations and incubation periods. Considering the limited biofilm formation capacity of *E. faecalis* ATCC 29212, *in vitro* studies testing the antimicrobial activity of endodontic products against biofilm could reconsider using this strain, and instead utilize multiple clinical strains.

CONCLUSION

The extent of *E. faecalis* biofilm formation *in vitro* is strain- and glucose-dependent. *E. faecalis* GS12 presented the greatest biofilm formation ability among the analyzed strains. *E. faecalis* ATCC 29212 and JH2-2 demonstrated a limited capacity to form biofilm over 7 days of incubation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Guy Simmons and Dr. Kirsten Lampi for technical support, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil, processes no. 5626-13-7 and no. 10342-12-5) for financial support. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

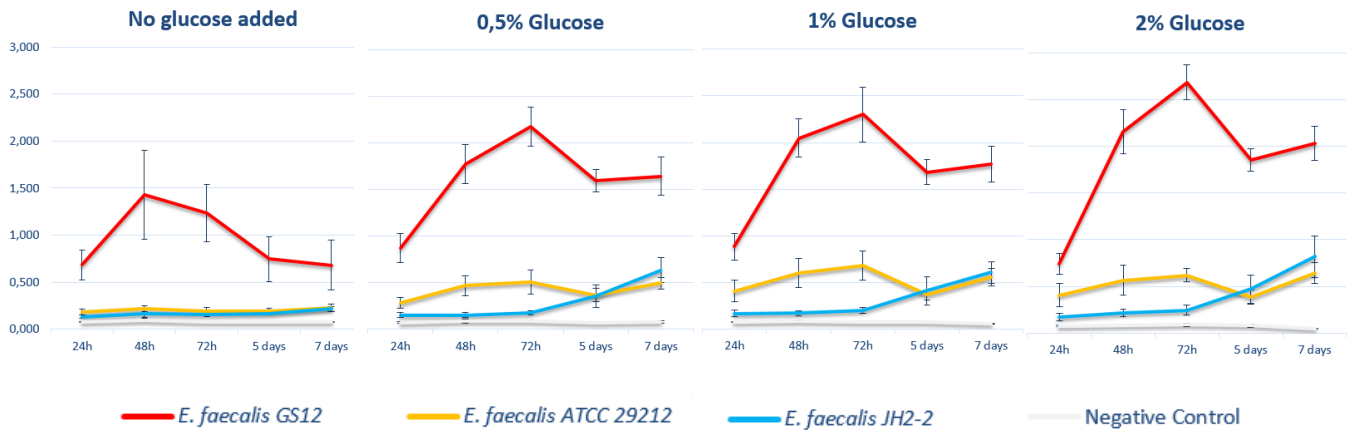
1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167–93.
2. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jul 15;236(2):163-73.
3. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
4. Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol.* 2012 Dec;19(12):1503–13.
5. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1277–88.
6. Tannock GW, Cook G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore MS, editor. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* Washington, DC: ASM Press; 2002;101–32.
7. Gomes BPF a, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia A a, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008 May;34(5):537–40.
8. Gomes BPF a, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia A a, Ferraz CCR, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Aug;102(2):247–53.
9. Pinheiro ET, Gomes BPF A, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):1–11.
10. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):85–94.
11. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006 Mar;32(3):173-7.
12. Ran S, He Z, Liang J. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: Changes in morphology, ultrastructure, physicochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts. *Arch Oral Biol.* 2013 Nov;58(11):1667–76.
13. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990 Aug;6(4):142–9.

14. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*. 2007 Dec;56(12):1581–8.
15. Sedgley C, Lennan S AO. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005 Oct;38(10):735-42.
16. Ran S, Wang J, Jiang W, Zhu C, Liang J. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. *Int Endod J*. 2015 Apr;48(4):362-72.
17. Chavez de Paz LE, Chávez de Paz L. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*. 2007 Jun;33(6):652–62.
18. Baca P, de Freitas MFA, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Arias-Moliz MT. In vitro enterococcus faecalis biofilm formation on five adhesive systems. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 May 1;17(3):e501-5.
19. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005 Dec;31(12):867-72.
20. Guerreiro-Tanomaru JM, De Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):346–50.
21. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):815–8.
22. Mohamed J a, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3658–63.
23. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, et al. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. 2011 May;37(5):631-6.
24. Sandoe JAT, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol*. 2003 Jul;52(7):547-50.
25. Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Arch Oral Biol*. 2013 Oct;58(10):1327–34.
26. Kristich CJ, Li Y, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. 2004 Jan;186(1):154-63.
27. Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, et al. *Enterococcus* spp. produces slim and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol*. 2001 Dec;190(3):113-20.

28. Jacob AE, Hobbs SJ. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol.* 1974 Feb;117(2):360-72.
29. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Feb;20(1):10-9.
30. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial Susceptibility of Monoculture Biofilms of a Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):95-7.
31. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GSP, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2010 Dec;36(12):1950-5.
32. Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ. *Enterococcus faecalis* Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Particulate Dentin. *J Endod.* 2006 Jul;32(7):634-7.
33. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):6032-9.
34. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Oct;67(10):4538-45.
35. Nakayama J, Chen S, Oyama N, Nishiguchi K, Azab EA, Tanaka E, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system: The small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. *J Bacteriol.* 2006 Dec;188(23):8321-6.
36. Shepard BD, Gilmore MS. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun.* 2002 Aug;70(8):4344-52.
37. La Rosa SL, Snipen LG, Murray BE, Willems RJ, Gilmore MS, Diep DB, et al. A Genomic Virulence Reference Map of *Enterococcus faecalis* Reveals an Important Contribution of Phage03-Like Elements in Nosocomial Genetic Lineages to Pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. 2015 May;83(5):2156-67.

Figures

Figure 1. Biofilm OD₅₇₀ readings (mean \pm SD) of *E. faecalis* strains ATCC 29212, GS12 and JH2-2 grown in TSB with 0% (No glucose added), 0.5%, 1% and 2% glucose supplementation over 7 days.



2.2 ARTIGO – Cell viability and *ftsZ* gene expression of *Enterococcus faecalis* biofilms exposed to alkaline pH.

**Este artigo será submetido ao periódico Journal of Endodontics*

ABSTRACT

Introduction: The persistence of *Enterococcus faecalis* in treated root canals has been attributed to survival mechanisms that include resistance to the high pH of antimicrobial agents used during treatment. This study evaluated the cell survival and expression of *ftsZ*, a cell division gene, in mature *E. faecalis* biofilms exposed to alkaline stress. **Methods:** Seventy-two hours *E. faecalis* GS12 biofilms exposed to pH 7, 10, 11, and 12 were assessed for cell viability and *ftsZ* gene expression at 24 h, 48 h, 72 h, 5 days and 7 days by using Live/Dead stain under confocal laser scanning microscopy and qPCR, respectively. **Results:** Biofilm volume reduced significantly in the first 24 h in all experimental groups ($p < 0.05$). At pH 7, most cells remained viable throughout the entire experiment ($90\% \pm 0.06\%$). At pH 10, no difference in proportion of live/dead cells was observed by the 5th day, but by the 7th day there were few remaining live cells ($p < .05$). At pH 11 and pH 12, most biovolume was composed of dead cells ($95.7\% \pm 4.53\%$ and $87.5\% \pm 10.38\%$, respectively) at any time point ($p < .05$). The expression of *ftsZ* in *E. faecalis* biofilm at pH 7 and pH 10 remained unaltered. No amplification was observed for pH 11 and pH 12. **Conclusion:** Alkaline environment affected *E. faecalis* GS12 biofilm structure and biofilm cell viability in a concentration- and time-dependent manners. Transcript levels of *ftsZ* gene remained unaltered at pH 7 and pH 10.

Key words: *Alkaline pH, biofilm, cell viability, Enterococcus faecalis, ftsZ gene expression.*

INTRODUCTION

Biofilms are complex communities of aggregated bacteria embedded in a self-secreted polymeric extracellular matrix and are characterized by changes in cells phenotype with respect to growth rate and gene transcription (1). The biofilm structure provides a successful strategy for bacteria to resist antimicrobial agents (2). When harbored in inaccessible anatomical niches such as isthmus, apical ramifications and lateral canals biofilms are difficult to eradicate (3,4). Both untreated and treated teeth with apical periodontitis revealed a high prevalence of bacterial biofilms at the apical third, 80% and 74%, respectively (5). Thus, the ability of bacteria to grow in a biofilm organization has been identified as a key factor in persistence of infections and bacterial recolonization after endodontic treatment (5,6).

Enterococcus faecalis is frequently recovered from root canals of teeth with failed root canal treatment, with prevalence reports of up to 90% of cases (7). The observed survival of *E. faecalis* in treated root canals can be attributed to several mechanisms including the capacity to resist adverse environmental conditions (8). These include the high pH of antimicrobial agents commonly used during treatment, in particular calcium hydroxide (pH<12) (3,9), as well as the ability of *E. faecalis* to adhere, colonize, and form biofilms on root canal walls, apical cementum, gutta-percha, and endodontic sealers (10,11).

Biofilms form in multiple steps that require intercellular signaling, and demonstrate a gene transcription profile that is distinct from that of planktonic cells (12). FtsZ is a prokaryotic cytoskeleton protein that plays a vital role in cell division by recruiting and serving as a scaffold for other division proteins (13,14). A previous study showed that *E. faecalis* JH2-2 grown under planktonic conditions at pH 10 at 37°C exhibited a 37-fold increase in *ftsZ* gene expression after 120 h (15). Similarly, Ran et al. (16) reported that *E. faecalis* biofilms developed in 24 h and 48 h culture at alkaline medium increased transcription of *ftsZ* by over 10 times at pH 10 and over 100 times at pH 11. However, the cell viability and expression of *ftsZ* in mature biofilms under stress caused by exposure to high pH has not been investigated. Hence, considering that the persistence of endodontic infections may be related to well establish biofilms, the aim of this study was to evaluate the survival and *ftsZ* gene expression in mature *E. faecalis* biofilms maintained in high pH conditions.

MATERIALS AND METHODS

E. faecalis GS12, a strain recovered from an endodontically treated tooth (17) was grown from -80°C stocks and plated onto Tryptic Soy Broth (TSB, Becton Dickinson and Co, Sparks, MD, USA) supplemented with 1.5% agar and incubated aerobically at 37°C for 24 h. A standardized bacterial suspension was prepared in TSB supplemented with 2% glucose (TSBg) (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) and adjusted to 3.0×10^8 CFU/mL using a calibrated spectrophotometer (Spectronic 20D, Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA) at 600 nm wavelength. Bacteria were grown under aerobic conditions at 37°C for all experiments.

Buffered TSBg solutions were prepared by mixing 0.2 M KH_2PO_4 and 0.2 M KOH for pH 7; 0.2 M NaHCO_3 and 0.2 M KOH for pH10; 0.2 M Na_2HPO_4 and KOH for pH 11; and 0.2 M KOH for pH 12 (18). Monitoring of pH was maintained throughout all experiments.

Cell viability of *E. faecalis* biofilms

Sterile hydroxyapatite (HA) disks (10 mm diameter and 2 mm thick; Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA) were coated with bovine dermal type I collagen (10 mg/mL collagen and 0.012 N HCl in sterile water) (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), for use as a biofilm substrate. The collagen coating of the HA disks (CHAs) was performed by overnight incubation at 4°C in a 35 mm plastic petri dish containing 2 mL of the collagen solution as described elsewhere (19).

CHAs were placed into the wells of flat-bottomed polystyrene 24-well microtiter plates with a 200 μL aliquot of the standardized bacterial suspension and 1.8 mL of TSBg. Media was renewed every 24 h. Plates were incubated for 72 h after which media was drawn off and biofilms were washed once with 2 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). To each well was added 2 mL of buffered TSBg solutions according to allocated pH (7, 10, 11, or 12) and plates were incubated aerobically at 37°C. Media was renewed every 24 h. Wells containing unbuffered TSBg (pH 6.52) served as positive controls for biofilm growth, and sterile TSBg served as negative controls. Experiments were performed in triplicate on three separate occasions.

CHAs were harvested at time 0 (72 h biofilm), and thereafter at 24 h, 48 h, 72 h, 5 days and 7 days, for confocal laser scanning microscope (CLSM) imaging to evaluate biofilm viability and morphology. Media was drawn off and each well was washed with 2 mL of PBS. CHAs were transferred to a glass slab. Biofilms were stained with SYTO-9 and propidium iodide (PI) Live/Dead reagents (BacLight Viability kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (11) and examined under a CLSM (Zeiss/Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system mounted on a Nikon E800 upright microscope) at X 40 magnification. Simultaneous two-channel imaging using 488 and 543 nm excitation was used to detect SYTO-9 (500-560 nm emission) and PI (650 nm emission). Confocal z-series composed by 16 image slices with 2 μm intervals were acquired from nine fields of view with zoom factor of 1.0, pixel resolution of 0.55 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, and field resolution of 512 x 512 pixels. Individual biofilm images covered an area of 275 μm^2 per field of view. Confocal z-series were converted to TIFF image stacks using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The image projections of z-series were transferred to BioImage_L Software (20) to evaluate total biovolume (μm^3), green biovolume (μm^3), and substrate coverage (%).

Quantification of *ftsZ* gene expression

A 2 mL aliquot of the standardized bacterial suspension was placed into 90 mm polystyrene culture plates containing 18 mL of TSBg. Media was renewed every 24 h. Plates were incubated for 72 h after which the media was drawn off and biofilms were washed once with 20 mL PBS. Plates were filled with 20 mL of buffered TSBg solutions according to allocated pH (7, 10, 11, or 12) and plates were incubated. Media was renewed every 24 h. At time 0 (72 h biofilm), 24 h, 48 h, 72 h, 5 days and 7 days media was drawn off. Biofilms were washed once with 20 mL PBS and harvested by scraping (Cell scraper, Fisher Scientific International Inc., Hampton, NH, USA) and stored in RNA*later* solution (Ambion, Austin, TX, USA) at -20°C. Plates with unbuffered TSBg (pH 6.52) were used as positive controls for biofilm growth, and sterile TSBg served as negative controls. Experiments were performed in triplicate on three separate occasions.

RNA extraction and reverse transcription was performed as described elsewhere (21). Quantitative PCR assays were performed using SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a DNA Engine Opticon 2 System

(Bio-Rad). Based on the final cDNA concentrations, 10 ng of cDNA samples were added to the reactions with 10 μ L of SYBR Select Master Mix, 0.3125 μ M of each primer and water to complete a total reaction volume of 20 μ L. Reactions were submitted to an uracil-DNA glycosylase (UDG) activation at 50°C for 2 min, and an initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s. A standard melting curve was used to check the quality of the amplification and to ensure specificity. The reference gene, 23S, was used as an internal control to which the expression of *ftsZ* gene was normalized. Fold changes in the levels of transcripts for each pH at each time point were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (22). Experiments were performed in triplicate on three separate occasions.

Primers

Primers were synthesized by Invitrogen (Eugene, OR). The primer sequences for *ftsZ* gene were: EfftsZ F: 5' CCGTCAAACAAGACAAGCGG 3' and EfftsZ R: 5' TCCCAATCGCCAAAAGCACT 3'. The primer sequences for the reference gene 23S were: Ef23S F, 5'- CCTATCGGCCTCGGCTTAG-3' and Ef23S R, 5'- AGCGAAAGACAGGTGAGAATCC-3'. The sizes of PCR amplicons were 105 bp and 101 bp, respectively (16).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed on GraphPad Prism software for Windows (Version 6.0; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Distribution of data was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. The two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test or Kruskal-Wallis test with Dunn post hoc tests were used when appropriated to compare confocal and qPCR data. Significance was set at 5%

RESULTS

Biofilm growth on HA discs

Figure 1 shows representative CLSM images of *E. faecalis* GS12 biofilm viability and substrate coverage at each pH and incubation period. Values for mean biofilm volume (μm^3) of live and dead cells at each pH and incubation period are shown in Figure 2. Initially (time zero), biofilm covered $45.29\% \pm 14.70\%$ of substrate surface and was mostly composed by living cells ($96\% \pm 0.03\%$). Biofilm total volume was

$8.24E+7 \pm 2.96E+7 \mu\text{m}^3$ (median $7.68E+7$). In the positive control group, biofilm volume remained stable throughout the experiment ($7.89E+7 \pm 2.87E+7 \mu\text{m}^3$; median $7.21E+7$) with most cells viable ($96\% \pm 0.03\%$). The biofilm coverage area reduced significantly (33.2%) by the 5th day of incubation.

In the first 24 h of alkaline challenge, all experimental groups presented a significant reduction on biofilm volume ($p < 0.05$). The approximate percentage of biofilm remaining volume compared to control group was 26% (pH 7), 55% (pH 10), 41% (pH 11) and 7% (pH 12). With the exception of pH 10, all experimental groups also presented a significant decrement of the area covered by biofilm ($p < 0.05$). The percentage area of biofilm on CHA discs after 24 h in alkaline media was $19.2\% \pm 7.8\%$ (pH 7), $25.5\% \pm 13.0\%$ (pH 11), $9.3\% \pm 11.9$ (pH12) (Table 1). At pH 7 the majority of cells remained viable throughout the entire experiment ($90\% \pm 0.06\%$). At pH 10 mostly of cells were viable ($77\% \pm 5\%$) until the 5th day when there was a significant biofilm detachment (coverage area, $26.64\% \pm 12.29\%$) and no difference in proportion of live and dead cells was observed ($p < .05$). Cells that remained attached to the surface were mostly dead ($97.9\% \pm 1.08\%$) by the 7th day. At pH 11 and pH 12, most biovolume was composed of dead cells ($95.7\% \pm 4.53\%$ and $87.5\% \pm 10.38\%$, respectively) at any time point ($p < .05$). The approximate percentage of the volume of living biofilm cells compared to time zero after 1 week in alkaline media was 10% (pH 7), 2% (pH 10), 0.3% (pH 11) and 0.08% (pH 12).

Monitoring of media pH

Overall the pH of buffered media remained within one unit over the duration of the experiment (Table 2). The pH of sterile media (6.52 ± 0.07 at baseline) remained stable throughout the experimental period (6.53 ± 0.07). As expected, the pH of positive control decreased over time (4.58 ± 0.24).

Expression of *fstZ*

Table 3 shows the fold change in level of *fstZ* transcripts in *E. faecalis* biofilms grown at pH 7 and pH 10 for 24 h, 48 h, 72 h, 5 days and 7 days. Expression of *fstZ* was comparable to the positive control with no difference between pH 7 and pH 10 ($p < .05$). No amplification was observed for pH 11 and pH 12 at any time point.

DISCUSSION

Interappointment intracanal medication with a high pH material such as calcium hydroxide is a frequently used resource in endodontics to complement the root canal disinfection (23,24). Its antimicrobial activity is dependent on the release of hydroxyl ions and the alkalization of the environment. *E. faecalis* demonstrates the ability to penetrate into dentinal tubules (25), adhere to root canal walls and form biofilms (5), which is appointed as a major factor in improving the resistance to adverse environmental conditions such as increased pH (26,27). CLSM biofilm analysis was used to assess cell membrane integrity and biofilm architecture of *E. faecalis* biofilms exposed to alkaline challenge for 7 days. Biofilms were challenged under stationary conditions (72 h) because it is reasonable to think that persistent root canal infections may shelter mature biofilms (28). A maximum incubation period of 7 days was established based on clinical protocol that recommends placement of intracanal Ca(OH)₂ dressings for 1 week to eliminate bacteria surviving biomechanical instrumentation of the root canal (15).

Calcium hydroxide pH is approximately 12.5-12.8 (9). When used as a root canal dressing, a diffusion gradient is observed into the dentin with pH values higher at the center than at the periphery of the tooth root (29). The buffering effect of dentin contribute to a decrease on calcium hydroxide pH (30) that, within dentinal tubules, only reaches approximately pH 10 (31). In the present study, *E. faecalis* biofilms better withstood to pH 10 but the number of viable cells declined over time. By the 5th day the volume of live and dead cells was equal, and by the 7th day only few viable cells remained. Although *E. faecalis* is known to withstand a high environmental pH such as pH 11 (15,16,27), biofilm structure and viability were substantially affected by pH 11 and 12 (Figures 1 and 2). Cells exposed to these conditions for 24 h were either detached or damaged (Figure 2). Thus, the lowest biovolume was observed at pH 12 ($p < 0.05$). Similarly, Chavez de Paz et al. (32) also observed the detachment of 15% of *E. faecalis* biofilm cells after only 5 min of exposure to pH 12.

E. faecalis biofilm presented unequal cell distributions on CHA discs under alkaline conditions (Figure 1) that might be related the significant reduction of the biofilm volume (Figure 2) and coverage area (Table 1) in the first 24 h ($p < 0.05$). Bacterial adherence to collagen-coated surfaces was evaluated by Kayaoglu et al. (33) who reported a gradual increase from pH 7.1 up to pH 8.5. Bacteria grown at pH 8.0

and pH 8.5 bound to collagen significantly better than when grown at pH 7.1, 9.0 and 9.5. This may explain why, despite a favorable live/dead ratio, almost 60% of biofilm cells detached in the first 24 h when exposed to pH 7. In the present study, the optimal biofilm maintenance pH was between 4.5 and 5.0 (Table 2).

Several cellular mechanisms such as the increase of membrane-bound proton system activity and surface hydrophobicity, biofilm formation, changes in cell division and the upregulation of virulence and stress response genes may play a role in *E. faecalis* resistance to alkaline environment (15,16,27). Previous studies evaluated the survival and gene expression of *E. faecalis* growing under alkaline stress in both planktonic (15) and biofilm (16) forms. However, the survival and expression of *ftsZ* gene of *E. faecalis* cells in mature biofilms under alkaline stress are still unclear. Cell division occurs in response to the availability of nutrients and the stage of the cell cycle (34). While a multitude of as yet not fully understood complex mechanisms occur leading up to cell division, the FtsZ protein is known to play an important role in forming the Z-ring which functions as the site of the septum of bacterial cell division (14). In a previous study, Appelbe and Sedgley (15) analyzed planktonic *E. faecalis* development under alkaline stress and observed that despite a decrease in viability of two-orders of magnitude at pH 10 at 72 h and 120 h, there were corresponding 20-fold and 37-fold increases in *ftsZ* transcript levels. Similarly, Ran et al. (16) observed an increase in *ftsZ* transcription (over 10 times at pH 10 and over 100 times at pH 11) in *E. faecalis* biofilms grown at alkaline pH for 24 h and 48 h. Further, they noted in transmission microscopy that cells under alkaline stress had irregular morphology defects in the division and loss of symmetry. The increase of *ftsZ* levels may lead to an asymmetric division process, producing daughter cells with reduced dimensions and/or enucleated cells (13,35). In the present study, the *ftsZ* levels of transcripts in *E. faecalis* biofilm exposed to alkaline challenge at pH 7 and pH 10 remained unaltered. One explanation for the divergence with Ran et al. (16) might be related to the maturity of the biofilm. Ran et al. evaluated developing biofilms while the present study evaluated the response of biofilms already established for 72 h. At this point, *E. faecalis* GS12 growing in similar conditions reached a stationary phase (28). Subsequently, it could be speculated that the absence of increased *ftsZ* expression may be attributable to cell division being more infrequent in mature biofilms (12). The biofilm exposure to pH 11 and pH 12 seems to affect significantly the adhesion and viability of cells even

after only 24 h, thus, no amplification was observed at any time point in such extreme conditions.

In conclusion, an alkaline environment affected mature *E. faecalis* GS12 biofilm structure and biofilm cell viability in a concentration-dependent and time-dependent manner. Transcript levels of *ftsZ* gene remained unaltered in mature *E. faecalis* biofilms exposed to pH 7 and pH 10 for 7 days.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Guy Simmons and Dr. Kirsten Lampi for technical support, Dr. Luiz Chavez de Paz (University of Connecticut Health Center) for providing the BioImage_L software for analysis of the biofilms, and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil, processes no. 5626-13-7 and no. 10342-12-5) for financial support. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

- 1 Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–93.
- 2 Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:322–32.
- 3 Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic Investigation of Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *J Endod* 2009;35:493–502.
- 4 Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2005;99:231–52.
- 5 Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277–88.
- 6 Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Top* 2004;9:27–36.
- 7 Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation Interactions Between Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis* and Bacterial Species Isolated From Persistent Apical Periodontitis. *J Endod* 2006;32:946–50.
- 8 Sedgley CM, Lennan SL, Applebe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Int Endod J* 2005;38:735–42.
- 9 Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide : a review *Int Den J* 2005; 55:293–301.
- 10 George S, Basrani B, Kishen A. Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: An in vitro study. *J Endod* 2010;36:1241–4.
- 11 Guerreiro-Tanomaru JM, De Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod* 2013;39:346–50.
- 12 Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-9.
- 13 Lutkenhaus J, Addinall SG. Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem* 1997;66:93–116.
- 14 Xiao J, Goley ED. Redefining the roles of the FtsZ-ring in bacterial cytokinesis. *Curr Opin Microbiol* 2016;34:90–6.
- 15 Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:169–74.
- 16 Ran S, He Z, Liang J. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress:

- Changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts. *Arch Oral Biol* 2013;58:1667–76.
- 17 Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:10–9.
 - 18 Nakajo K, Nakazawa F, Iwaku M, Hoshino E. Alkali-resistant bacteria in root canal systems. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:390–4.
 - 19 Shen Y, Qian W, Chung Ch, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the Effect of Two Chlorhexidine Preparations on Biofilm Bacteria In Vitro: A Three-Dimensional Quantitative Analysis. *J Endod* 2009;35:981–5.
 - 20 Chávez De Paz LE. Image Analysis Software Based on Color Segmentation for Characterization of Viability and Physiological Activity of Biofilms. *Appl Environmental Microbiol* 2009;75:1734–9.
 - 21 Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem* 2007;365:208–14.
 - 22 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* 2001;25:402–8.
 - 23 Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119–25.
 - 24 Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:297–306.
 - 25 Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142–9.
 - 26 Brändle N, Zehnder M, Weiger R. Impact of Growth Conditions on Susceptibility of Five Microbial Species to Alkaline Stress 2008;34:579–82.
 - 27 Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanism Involved in The Resistance of The *Enterococcus faecalis* to Calcium Hydroxide. *J Int Endod* 2002;35:221–8.
 - 28 Rosa TP, Signoretti FGC, Gomes BPFA, Jacinto RC. Avaliação do desenvolvimento de biofilmes de cepas de *Enterococcus faecalis* sob gradiente de concentração de glicose. *Braz Oral Res* 2015;29(Suppl. 1):284.
 - 29 Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17–21.
 - 30 Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33:126–31.

- 31 Esberard RM, Carnes DL, del Rio CE. Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. *J Endod* 1996;22:402–5.
- 32 Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *J Endod* 2010;36:70–7.
- 33 Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int Endod J* 2005;38:389–96.
- 34 Jonas K. To divide or not to divide: Control of the bacterial cell cycle by environmental cues. *Curr Opin Microbiol* 2014;18:54–60.
- 35 Ward JE, Lutkenhaus J. Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell* 1985;42:941–9.

TABLES AND FIGURES

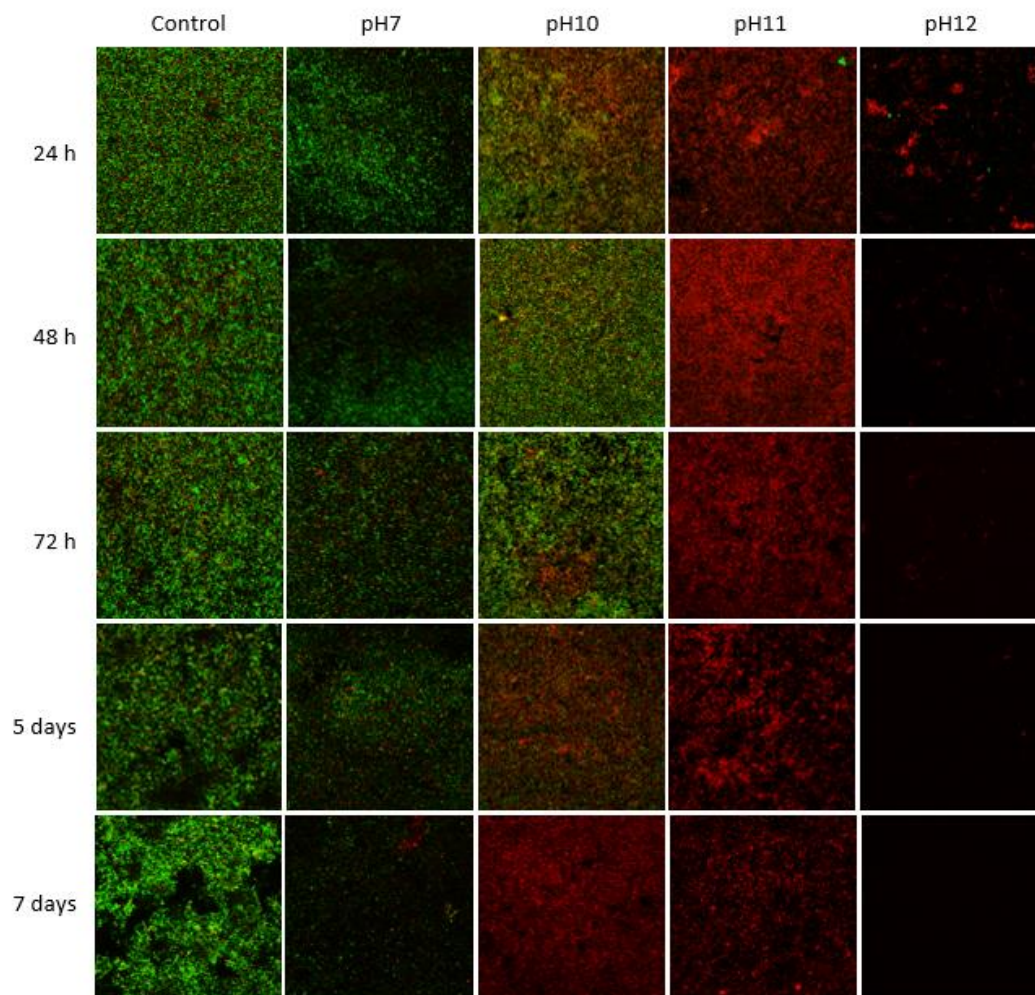
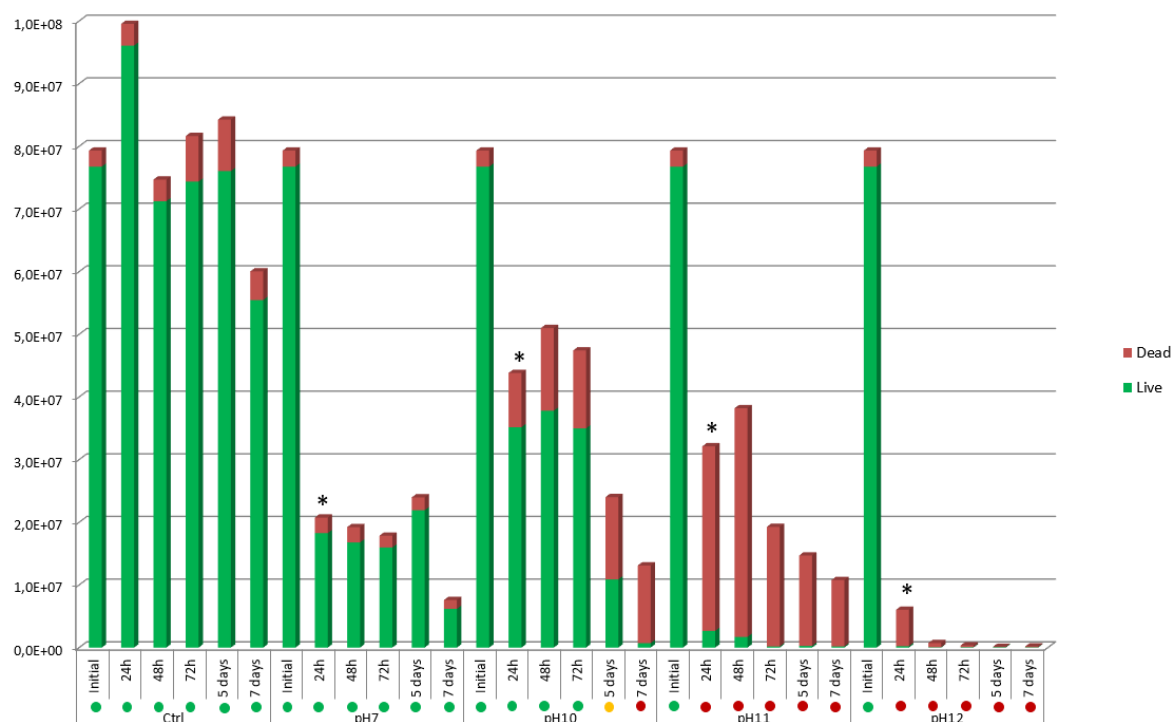
Figure 1. Cell viability changes in *E. faecalis* biofilms at alkaline pH (x 40).

Figure 2. Graphic of biofilm volume (μm^3) mean values.

● Majority of biofilm volume composed by live cells ($p < 0.05$).

● No statistical difference between the volume of live and dead cells ($p > 0.05$).

● Majority of biofilm volume composed by dead cells ($p < 0.05$).

* Significant reduction on biofilm total volume (μm^3) within group compared to the prior experimental period ($p < 0.05$).

TABLE 1. Percentage of substrate coverage (%) (mean \pm SD).

	Ctrl*	pH 7	pH 10	pH 11	pH 12
Initial	45.29 \pm 14.70 ^a	45.29 \pm 14.70 ^a	45.29 \pm 14.70 ^a	45.29 \pm 14.70 ^a	45.29 \pm 14.70 ^a
24 h	47.65 \pm 12.95 ^a	19.20 \pm 7.80 ^b	41.78 \pm 14.99 ^a	25.50 \pm 13.01 ^b	9.32 \pm 11.89 ^b
48 h	43.99 \pm 10.11 ^a	14.70 \pm 4.76 ^b	49.38 \pm 17.81 ^a	28.98 \pm 13.46 ^b	3.74 \pm 5.61 ^b
72 h	41.83 \pm 10.19 ^a	14.24 \pm 6.34 ^b	41.16 \pm 10.05 ^a	17.25 \pm 8.08 ^c	4.64 \pm 7.18 ^b
5 days	30.24 \pm 9.43 ^b	13.79 \pm 4.90 ^b	26.64 \pm 12.29 ^b	18.86 \pm 15.54 ^c	0.18 \pm 0.15 ^b
7 days	26.33 \pm 10.03 ^b	8.78 \pm 7.15 ^b	15.02 \pm 3.49 ^c	13.25 \pm 6.92 ^c	2.47 \pm 5.54 ^b

*Growth in unbuffered media

Value followed by different superscript letters indicate statistically significant differences within groups ($p < 0.05$).

TABLE 2. Media pH monitoring (mean \pm SD)

	pH 7	pH 10	pH 11	pH 12	Unbuffered Negative control	Unbuffered Positive control*
Initial	7,33 \pm 0.08	10,06 \pm 0.04	11,16 \pm 0.04	12,10 \pm 0.11	6,52 \pm 0.07	6,52 \pm 0.07
24 h	6,95 \pm 0.08	10,08 \pm 0.04	10,99 \pm 0.05	11,41 \pm 0.11	6,55 \pm 0.10	5,06 \pm 0.11
48 h	6,67 \pm 0.16	10,03 \pm 0.02	10,94 \pm 0.04	11,30 \pm 0.07	6,55 \pm 0.03	4,60 \pm 0.09
72 h	6,36 \pm 0.15	10,06 \pm 0.09	10,93 \pm 0.05	11,21 \pm 0.08	6,47 \pm 0.03	4,41 \pm 0.07
5 days	6,04 \pm 0.06	10,00 \pm 0.03	10,85 \pm 0.03	11,09 \pm 0.07	6,53 \pm 0.10	4,51 \pm 0.03
7 days	6,06 \pm 0.07	9,95 \pm 0.03	10,80 \pm 0.04	11,05 \pm 0.06	6,55 \pm 0.02	4,64 \pm 0.01

* with standard inoculum

TABLE 3. Fold-change in level of *ftsZ* gene transcripts in *E. faecalis* biofilms grown in pH 7 and pH 10 media relative to unbuffered media (mean \pm SD).

	24h	48h	72h	5 days	7 days
pH7	-0.54 \pm 0.45	-0.74 \pm 0.46	-1.23 \pm 1.27	-0.93 \pm 1.35	-0.38 \pm 0.44
pH10	-0.22 \pm 0.38	-0.62 \pm 0.96	-0.28 \pm 0.25	-0.10 \pm 0.23	-0.27 \pm 0.32

3 DISCUSSÃO

O conhecimento dos principais patógenos endodônticos e suas implicações na patogênese de doenças perirradiculares tem o potencial de proporcionar subsídios para o desenvolvimento de estratégias antimicrobianas mais eficazes no tratamento das infecções endodônticas tanto primárias, como secundárias e/ou persistentes (Rôças et al., 2004).

E. faecalis é descrito como a espécie mais frequentemente encontrada em canais radiculares de casos de insucesso no tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003; Siqueira e Rôças, 2004; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008). É possível encontrar evidências na literatura que suportam a especulação de que o tratamento endodôntico pode atuar nos canais radiculares contaminados como um agente de seleção para esses microrganismos (Chavez De Paz et al., 2003). Esta seleção pode estar relacionada a baixa sensibilidade ao hipoclorito de sódio (Orstavik, and Haapasalo, 1990) e a capacidade de resistir a condições ambientais adversas como na escassez nutricional (Kayaoglu e Orstavik, 2004) e na elevação do pH do ambiente promovida pelo hidróxido de cálcio (Evans et al., 2002; Appelbe e Sedgley, 2007). Além disso, *E. faecalis* possui a habilidade de penetrar nos túbulos dentinários (Orstavik e Haapasalo, 1990) e aderir às paredes do canal radicular formando biofilme (Mohamed e Huang, 2007).

Ainda não são bem compreendidas as condições em que biofilmes de *E. faecalis* são formados *in vivo* e *in vitro* em canais radiculares (Svensater e Bergenholtz, 2004; George et al., 2005; Seneviratne et al., 2013). Talvez, esta seja a principal razão para a existência de vários modelos de biofilme de *E. faecalis* no teste de irrigantes, medicamentos e soluções anti-sépticas em endodontia. De fato, diversos aspectos intrínsecos e ambientais podem influenciar a formação, a estrutura e a susceptibilidade a agentes antimicrobianos de um biofilme tanto *in vivo* como *in vitro*. A disponibilidade de nutrientes no meio e o tipo de substrato, por exemplo, não apenas influenciam a adesão inicial das células colonizadoras mas também a produção de moléculas de sinalização que controlam a fisiologia celular e a virulência (Chavez de Paz et al., 2010).

No presente estudo, de uma forma geral, a adição de glicose resultou em um aumento na formação de biofilme *in vitro* de *E. faecalis* ($p < 0,05$). Dentro dos parâmetros utilizados, o aumento no volume dos biofilmes parece ser diretamente

proporcional a concentração de glicose. Achados semelhantes foram relatados por Seneviratne et al. (2013), que observaram que a adição de 2% de glicose ao meio TSB e ao meio BHI proporcionou maior biomassa em biofilmes de *E. faecalis* ao longo de 7 dias. É importante observar que embora o meio TSB possua glicose em sua fórmula (0,25%), essa baixa concentração pareceu ser insuficiente para afetar positivamente a formação de biofilme.

Além da influência das condições ambientais, observa-se que nem todas as cepas se comportam da mesma maneira. A dinâmica de crescimento de biofilme da cepa referência de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi comparada a uma cepa mutante de JH2 (JH2-2), resistente ao ácido fusídico e a rifampicina, e a uma cepa clínica coletada de um retratamento endodôntico (GS12). *E. faecalis* ATCC 29212, uma cepa de origem no trato urinário, é usada para controle de qualidade e na grande maioria dos trabalhos *in vitro* e *ex vivo* que testam produtos endodônticos contra bactérias planctônicas e em biofilme (George et al., 2005; Baca et al., 2012; Guerreiro-Tanomaru et al., 2013).

Ao longo de 7 dias de incubação, as cepas ATCC 29212 e JH2-2 não formaram biofilme quando incubadas em meio TSB sem suplementação de glicose. Em meio suplementado, a cepa ATCC 29212 apresentou um crescimento significativo de biomassa, no entanto, o valor médio máximo de densidade óptica alcançado (OD_{570}) foi de apenas 0,678. A cepa JH2-2, por sua vez, mostrou um ligeiro aumento na biomassa apenas após 5 dias de incubação em meio suplementado (máx. OD_{570} = 0,820). Essa capacidade limitada de formação de biofilme apresentada pela cepa JH2-2 também foi observada em um estudo realizado por Duggan e Sedgley (Duggan e Sedgley, 2007). Entre as cepas analisadas, GS12 apresentou maiores volumes de biofilme em todos os momentos e em qualquer concentração de glicose testada (máx. OD_{570} = 2.689).

A distinta capacidade de formar biofilme apresentada por cepas de uma mesma espécie pode ter sua explicação em seus particulares fatores de virulência (Mohamed et al., 2004; Sedgley et al., 2005; Zhu et al., 2010). As proteínas de superfície como a substância de agregação (Asa), o antígeno endocardite (EfaA), antígeno de ligação ao colágeno (Ace) e a proteína de superfície enterocócica (Esp) foram associados a adesão celular e formação de biofilmes (Toledo-Arana et al., 2001; Tendolkar et al., 2004; Sedgley et al., 2005; Kowalski et al., 2006). Uma correlação

positiva entre a formação de biofilme e a presença de GelE e seu operon regulador *fsr* também foi relatada (Shepard e Gilmore, 2002; Nakayama et al., 2006). *E. faecalis* ATCC 29212 possui os genes *gelE*, *asa*, *ace*, *efaA* em seu genoma, porém, não apresenta os gene *esp* e o operon *fsr* (Zhu et al., 2010). *E. faecalis* GS12 é *gelE*, *fsr*, *esp*, *asa*, *ace* e *efaA* positivo (Sedgley et al., 2005) enquanto *E. faecalis* JH2-2 é uma cepa *esp* e *fsr* negativa (La Rosa, et al., 2015).

Considerando que nem todas as cepas de uma espécie comportam-se de forma semelhante e que a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de *E. faecalis* ATCC 29212 se manifestou de forma limitada, é razoável sugerir que estudos que envolvam biofilme *in vitro* de *E. faecalis* para testar a atividade antimicrobiana de produtos em endodontia devam reconsiderar o uso isolado dessa cepa, ponderando, para este fim, seu uso concomitante a outras cepas clínicas.

EXPOSIÇÃO AO PH ALCALINO

Em situações clínicas, a pasta de hidróxido de cálcio é frequentemente utilizada como medicação intracanal para suplementar o combate microbiano a fim de eliminar bactérias que sobreviveram ao preparo químico-mecânico protegidas pela estrutura do biofilme em regiões de difícil acesso aos instrumentos. A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio está relacionada a liberação de ions hidroxila e o conseqüente aumento do pH em ambientes aquosos. O elevado pH imposto pelo hidróxido de cálcio pode danificar o DNA e a membrana citoplasmática bacteriana, além de promover desnaturação proteica (Siqueira e Lopes, 1999). Diversas espécies bacterianas habitualmente encontradas em canais radiculares infectados são facilmente eliminadas após um curto período em contato direto com essa substância. (Bystrom et al., 1985). Contudo, é notório que a completa eliminação dos microrganismos que infectam o sistema de canais radiculares é raramente alcançada pelo preparo químico-mecânico e medicação intracanal (Bystrom et al., 1985; Siqueira e Rôças, 2008).

E. faecalis é conhecido por ser um microorganismo de difícil erradicação, capaz de suportar ambientes altamente alcalinos (Evans et al., 2002; Ran et al., 2013). Evans et al. (2002) observaram que *E. faecalis* foi capaz de resistir ao pH 11,1; porém, não resistiu ao pH 11,5. Quando as células planctônicas foram expostas ao hidróxido

de cálcio (pH 11,1) por 30min., 0,4% das células sobreviveram, porém, um aumento relativamente pequeno da alcalinidade (pH11,5) resultou em uma drástica queda na taxa de sobrevivência, apenas $1,3 \times 10^{-6}\%$ das células sobreviveram. Applebe e Sedgley (2007) verificaram que a taxa de sobrevivência de células planctônicas de *E. faecalis* foi inversamente proporcional ao aumento do pH. Enquanto a exposição por 7 dias ao pH neutro não afetou a viabilidade celular, 1% das células se mostraram viáveis em pH 10, 0,001% das células resistiram ao pH 11 e apenas $1 \times 10^{-5}\%$ das células remanesceram viáveis quando expostas ao pH 12. No presente estudo, a estrutura do biofilme e a viabilidade de suas células foram, de forma geral, significativamente afetadas pela exposição ao pH elevado. O pH ideal de manutenção do biofilme foi de $4,60 \pm 0,21$. Ao submeter o biofilme ao pH 12 por 24 h, por exemplo, verificou-se um descolamento celular significativo ($\approx 80\%$) e a inviabilidade da maioria das células remanescentes. De forma semelhante, Chavez de Paz et al. (2010) observaram um descolamento de 15% das células do biofilme após apenas 5 minutos de exposição ao pH 12.

Durante os 7 dias de incubação, nos grupos em que o biofilme foi exposto ao pH 11, a maior parte de seu volume foi composta por células mortas. Em pH 10, o biofilme reduziu gradativamente o número de células viáveis, a área de cobertura de superfície e o biovolume total durante todo o experimento. No quinto dia de incubação o número de células vivas e mortas dentro do biofilme atingiu igualdade estatística. Quando exposto ao pH 7, apesar de uma proporção favorável de células vivas, quase 60% das células do biofilme foram destacadas nas primeiras 24 horas. Kayaoglu et al. (2005) ao avaliarem a adesão inicial (2 horas de incubação) de *E. faecalis* ao colágeno relataram um aumento gradual de células aderidas entre o pH 7,1 e pH 8,5. As bactérias apresentaram em pH 8,0 e pH 8,5 um biovolume significativamente maior do que as cultivadas em pH 7, pH 9,0 e pH 9,5. Contudo, este resultado surpreendente parece contraditório e, por conseguinte, continua a ser o objeto de investigação mais aprofundada.

EXPRESSÃO DO GENE *ftsZ*

O microambiente pode regular a expressão de genes que, por sua vez, permitem que os microrganismos se adaptem as condições variadas (Jett et al., 1994).

Isso determina a sobrevivência em ambientes com escassez nutricional e o rearranjo quando a fonte nutricional é reestabelecida (Rôças et al., 2004). Mecanismos celulares tais como a regulação de genes de virulência e de resposta ao estresse; a formação de biofilmes; o aumento da atividade da bomba de prótons ligada à membrana, a alteração na hidrofobicidade de superfície e a taxa de divisão celular podem desempenhar papéis importantes na sobrevivência de *E. faecalis* ao estresse alcalino (Evans et al., 2002; Appelbe e Sedgley, 2007; Ran et al., 2013).

FtsZ é uma proteína homóloga a tubulina que desempenha um papel importante na divisão celular dos procariontes (Lutkenhaus e Addinall, 1997). Esta proteína é uma das primeiras a se posicionar no local em que ocorre a divisão celular e compõe uma estrutura chamada “anel FtsZ” ou “anel Z” (Margolin, 2015). É o anel Z que define o local e o momento em que o septo para divisão celular é formado.

Em um estudo anterior, Appelbe e Sedgley (2007) ao analisar a viabilidade e expressão gênica de células planctônicas de *E. faecalis* sob estresse alcalino observaram que, apesar de uma significativa diminuição na viabilidade celular em 72 h e 5 dias de incubação em pH 10, houve um aumento na transcrição do gene *ftsZ* de 20 a 37 vezes, respectivamente. Ran et al. (2013) ao avaliar a formação de biofilme de *E. faecalis* em pH alcalino, durante 24 h e 48 h também observaram um aumento na transcrição do gene *ftsZ* (mais de 10 vezes em pH 10 e mais de 100 vezes em pH 11). Os autores verificaram por microscopia de transmissão que as células sob estresse alcalino apresentavam defeitos morfológicos devido ao processo de divisão assimétrica e irregular. Esses defeitos provocados pelo aumento dos níveis de *ftsZ*, pode resultar na geração de células filhas com dimensões reduzidas e/ou anucleadas (Ward e Lutkenhaus, 1985; Lutkenhaus e Addinall, 1997). No presente estudo, os níveis de transcrição do gene *ftsZ* em biofilmes de *E. faecalis* expostos ao pH 7 e pH 10 permaneceram inalterados. Uma explicação para o resultado divergente pode estar relacionado com a maturidade do biofilme. Ran et al. (2013) avaliaram o desenvolvimento de um biofilme em pH alcalino enquanto que o presente estudo avaliou a resposta de um biofilme maduro ao desafio alcalino, portanto, em um momento de maior estabilidade. A divisão celular é pouco frequente em biofilmes maduros, nesses casos, a energia é normalmente destinada a produzir matriz polimérica, que as células do biofilme podem usar como nutriente (Watnick e Kolter, 2000).

Dividir-se ou não é uma resolução celular importante, especialmente aquelas que estão expostas a mudanças ambientais drásticas. A proliferação e crescimento sob condições adversas pode comprometer a integridade celular (Jonas, 2014).

4 CONCLUSÃO

- A formação de biofilme de *E. faecalis in vitro* é dependente tanto da cepa quanto da concentração de glicose presente no meio;
- Entre as três cepas de *E. faecalis*, GS12 exibiu maior habilidade em formar biofilme *in vitro*;
- *E. faecalis* ATCC 29212 e JH2-2 demonstraram uma capacidade limitada de produzir biofilme *in vitro* durante 7 dias;
- O ambiente alcalino afeta a estrutura e a viabilidade celular do biofilme maduro de *E. faecalis* de forma dependente da concentração e do tempo de exposição.
- Os níveis de transcritos do gene *ftsZ* em biofilmes maduros de *E. faecalis* permanecem inalterados ao longo de 7 dias de exposição ao pH 7 e pH 10.

REFERÊNCIAS*

1. Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol. Immunol.* 2007; 22(3): 169–74.
2. Baca P, de Freitas MFA, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Arias-Moliz MT. In vitro *enterococcus faecalis* biofilm formation on five adhesive systems. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2012; 17.
3. Baldassarri L, R C, L B, MG A, F I, CR A, et al. *Enterococcus* spp. produces slim and survives in rat peritoneal macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 2001; 190(3): 113–20.
4. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod. Dent. Traumatol.* 1985; 1(5): 170–5.
5. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(6): 1771–6.
6. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *J. Endod.* 2010; 36(1): 70–7.
7. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J. Endod.* 2007; 33(6): 652–62.
8. Chavez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller Å, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int. Endod. J.* 2003; 36(7): 500–8.
9. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2): 167–93.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

10. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* 2007; 33(7): 815–8.
11. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Fidgor D. Mechanism Involved in The Resistance of The *Enterococcus faecalis* to Calcium Hydroxide. *J. Int. Endod.* 2002; 35: 221–8.
12. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009. p. : 1749–57.
13. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63(2): 812–4.
14. Garrido T, Scnchez M, Palacios P, Aldea M, Vicente M. Transcription of *ftsZ* oscillates during. 1993; 12(10): 3957–65.
15. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* 2005; 31: 867–72.
16. Gomes BPF a, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia A a, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J. Endod.* 2008; 34(5): 537–40.
17. Gomes BPFa, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2006; 102(2): 247–53.
18. Guerreiro-Tanomaru JM, De Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J. Endod.* 2013; 39(3): 346–50.
19. Haussler S, Fuqua C. Biofilms 2012: New discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. *J. Bacteriol.* 2013. p. : 2947–58.

20. Imura N, Pinheiro ET, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: A retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J. Endod.* 2007; 33: 1278-82.
21. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. p. : 163–73.
22. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; 57(6): 462–78.
23. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation Interactions Between Oral and Endodontic Enterococcus faecalis and Bacterial Species Isolated From Persistent Apical Periodontitis. *J. Endod.* 2006; 32: 946–50.
24. Jonas K. To divide or not to divide: Control of the bacterial cell cycle by environmental cues. *Curr. Opin. Microbiol.* Elsevier Ltd; 2014; 18(1): 54–60.
25. Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.* 2012; 19(12): 1503–13.
26. Joseleau-petit LE, Vinella D, Ari RD. MINIREVIEW Metabolic Alarms and Cell Division in Escherichia coli. 1999; 181(1): 9–14.
27. Kakehashi R, Stanley H, Fitzgerald R. The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral surgery, oral Med. oral Pathol.* 1965; 20: 340–9.
28. Kayaoglu G, Erten H, Alaçam T, Ørstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards Enterococcus faecalis. *Int. Endod. J.* 2005; 38(7): 483–8.
29. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence Factors of Enterococcus Faecalis: Relationship To Endodontic Disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2004; 15(5): 308–20.
30. Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ. Enterococcus faecalis Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Particulate Dentin. *J. Endod.* 2006; 32: 634–7.
31. Kristich CJ, Li Y, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-Independent Biofilm

Formation by *Enterococcus faecalis*. 2004; 186(1): 154–63.

32. Lutkenhaus J, Addinall SG. Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* 1997; 66: 93–116.

33. Margolin W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 6(11): 862–71.

34. Marsh PD. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J. Clin. Periodontol.* 2005. p. : 7–15.

35. Mohamed J a, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(6): 3658–63.

36. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 12): 1581–8.

37. Nakayama J, Chen S, Oyama N, Nishiguchi K, Azab EA, Tanaka E, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* fsr quorum-sensing system: The small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 8321–6.

38. Ng Y-L, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int. Endod. J.* 2007; 40(12): 921–39.

39. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. Outcome of secondary root canal treatment: A systematic review of the literature. *Int. Endod. J.* 2008a; 41(12): 1026–46.

40. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature - Part 2. Influence of clinical factors. *Int. Endod. J.* 2008b; 41(1): 6–31.

41. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.* 1990; 6(4): 142–9.

42. Paqué F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of Oval-shaped Root

Canals in Mandibular Molars Using Nickel-Titanium Rotary Instruments: A Micro-computed Tomography Study. *J. Endod.* 2010; 36(4): 703–7.

43. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int. Endod. J.* 2003; 36(1): 1–11.

44. Ran S, He Z, Liang J. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: Changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts. *Arch. Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2013; 58(11): 1667–76.

45. Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int. Endod. J.* 1995; 28(1): 12–8.

46. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J. Endod.* 2010; 36(8): 1277–88.

47. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J. Endod.* 2004; 30(5): 315–20.

48. La Rosa SL, Snipen L, Murray BE, Willems RJL, Gilmore MS, Diep DB, et al. A Genomic Virulence Reference Map of *Enterococcus faecalis* Reveals an Important Contribution of Phage03-Like Elements in Nosocomial Genetic Lineages to Pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. 2015; 83(5): 2156–67.

49. Sandoe JAT, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 547–50.

50. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J. Endod.* 2006; 32(3): 173–7.

51. Sedgley CM, Molander a., Flannagan SE, Nagel a. C, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic

Enterococcus spp. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20(21): 10–9.

52. Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Arch. Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2013; 58(10): 1327–34.

53. Shepard BD, Gilmore MS. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect. Immun.* 2002; 70(8): 4344–52.

54. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: Why well-treated teeth can fail. *Int. Endod. J.* 2001. p. : 1–10.

55. Siqueira JF, Araújo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J. Endod.* 1997; 23(8): 499–502.

56. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *Int. Endod. J.* 1999; 32(5): 361–9.

57. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J. Endod.* 2008; 34(11).

58. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2004; 97(1): 85–94.

59. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56: 187–209.

60. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* 2006. p. : 93–8.

61. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1998; 85(1): 86–93.

62. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod. Top.* 2004; 9(1): 27–36.
63. Tannock GW, Cook G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore MS, editor. *enterococci Pathog. Mol. Biol. Antibiot. Resist.* Washington, DC: ASM Press; 2002. p. : 101–32.
64. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2004; 72: 6032–9.
65. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(10): 4538–45.
66. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J. Endod.* 2011; 37: 631–6.
67. Ward JE, Lutkenhaus J. Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell.* 1985; 42(3): 941–9.
68. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 2000; 182(10): 2675–9.
69. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GSP, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J. Endod.* Elsevier Ltd; 2010; 36(12): 1950–5.

APÊNDICE 1 – Detalhamento da metodologia

ARTIGO 1

FORMAÇÃO DOS BIOFILMES

As cepas *E. faecalis* ATCC 29212, JH2-2 e GS12, armazenada em freezer - 80°C, foram ativadas em meio Tryptic Soy Agar (Becton Dickinson and Co, Sparks, MD, USA) em aerobiose à 37°C, *overnight*.

Colônias isoladas foram inoculadas em meio TSB ajustado a uma concentração de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL em espectrofotômetro à um comprimento de onda de 600 nm (Spectronic 20D, Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA). Alíquotas de 20µL de cada suspensão bacteriana foram pipetadas em poços de placas de 96 poços de fundo chato (Corning Costar, Tewksbury, MA, USA). Em cada poço foi adicionado 180µL de TSB suplementado com 0%, 0,5%, 1% ou 2% de glicose (EMD Millipore, Darmstadt, Germany). Poços não-inoculados foram preenchidos com 200µL de meio TSB estéril e utilizados como controle negativo de crescimento bacteriano. As placas foram incubadas à 37°C em aerobiose por até 7 dias. O meio foi substituído a cada 24h.

QUANTIFICAÇÃO DOS BIOFILMES DE *E. FAECALIS* UTILIZANDO A COLORAÇÃO CRISTAL VIOLETA (CV)

Nos períodos experimentais de 24h, 48h, 72h, 5 dias e 7 dias foram realizadas as mensurações das densidades ópticas (OD) utilizando uma coloração cristal violeta (22). Inicialmente, o meio foi drenado e cada poço foi enxaguado com 200µL de PBS. Os biofilmes foram fixados por 15min com 200µL de uma solução de paraformaldeído 1% e 1mM CaCl₂ em PBS, e em seguida os poços foram enxaguado com 200µL de PBS. Os biofilmes foram corados com 200µL de Cristal Violeta 0,01% por 15min e os poços foram novamente enxaguados com 200µL de PBS. O CV aderido foi dissolvido em 200µL da solução etanol-cetona (80:20, vol/vol) por 5 min. A densidade óptica foi mensurada em espectrofotometro leitor de microplaca à um comprimento de onda de 570nm (Bio-Tek - Synergy HT, Winooski, VT, USA). Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata em 3 ocasiões distintas.

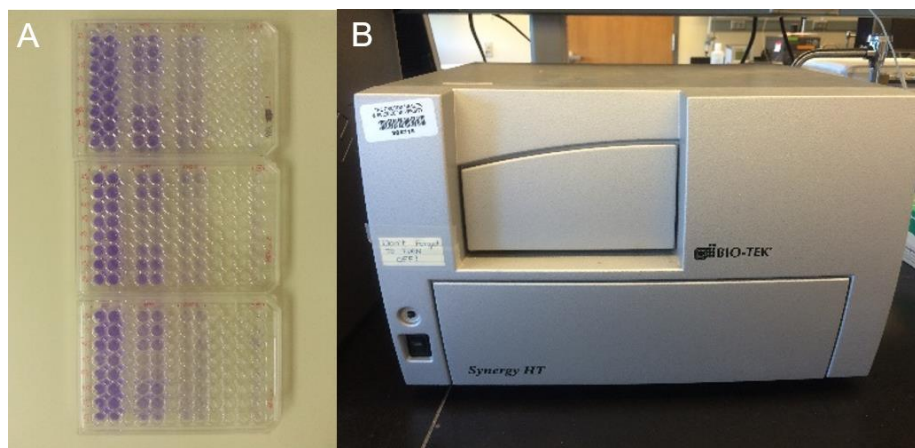


Figura 1: A) Cristal Violeta dissolvido em solução etanol-cetona; B) Espectrofotometro leitor de microplaca (Bio-Tek - Synergy HT, Winooski, VT, USA).

ARTIGO 2

A cepa *E. faecalis* GS12, armazenada em freezer -80°C , foi ativada em meio Tryptic Soy Agar por 24 h em aerobiose à 37°C . Colônias isoladas foram inoculadas em meio TSB suplementado com 2% glicose (TSBg). Esse inóculo foi ajustado a uma concentração de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL em espectrofotômetro à um comprimento de onda de 600 nm.

Foram preparadas soluções de TSBg tamponadas em pH 7 (0,2 M KH_2PO_4 e 0,2 M KOH); pH 10 (0,2 M NaHCO_3 e 0,2 M KOH); pH 11 (0,2 M Na_2HPO_4 e KOH); e pH 12 (0,2 M KOH) (Nakajo et al., 2004).

FORMAÇÃO DOS BIOFILMES PARA OS ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Discos de hidroxiapatita estéreis (HA) (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura; Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA) revestidos por colágeno bovino tipo I (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) serviram como substrato para formação de biofilme. Os discos HA foram colocados em placas petri de 35 mm e imersos *overnight* em 2 mL de uma solução de 10 mg/mL colágeno e 0,012 N HCl em H_2O estéril à 4°C (Shen et al., 2009).

Os discos HA revestidos por colágeno (CHA) foram transferidos para poços de placas de 24 poços com fundo plano. Em cada poço, foram adicionados alíquotas de 200 μL da suspensão bacteriana padrão e 1,8 mL de TSBg. Os biofilmes foram formados por 72h em aerobiose à 37°C . O meio foi substituído a cada 24 h. Após 72

h de incubação o meio foi drenado e os poços foram enxaguados com 2 mL de PBS. Em cada poço foi adicionado 2 mL de meio TSBg tamponado de acordo com o pH (7, 10, 11 ou 12). Poços com TSBg (pH 6,52) sem a adição de substâncias para controle do pH foram utilizados como controle positivo do crescimento do biofilme. O controle negativo de crescimento bacteriano foi realizado através de poços contendo TSBg sem a adição do inóculo. As placas foram incubadas em aerobiose à 37°C por até 7 dias. O meio foi substituído a cada 24 h. O monitoramento do pH foi realizado durante todo o experimento a cada substituição dos meios.

ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade e a estrutura dos biofilmes foram analisadas em microscopia confocal eletrônica de varredura a laser (CLSM) nos períodos experimentais: inicial (biofilme de 72h), 24h, 48h, 72h, 5 dias e 7 dias de exposição ao pH alcalino. O meio foi drenado e cada poço foi enxaguado com 2 mL de PBS. Os CHAs foram transferidos para uma placa de vidro (Figura 2). Os biofilmes foram corados com SYTO-9 e Iodeto de Propídeo (IP), reagentes do kit Live/Dead (BacLight Viability kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), por 10 minutos (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013).

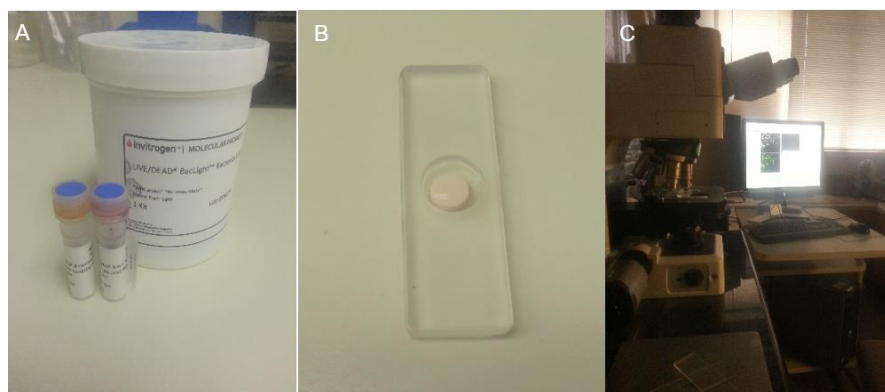


Figura 2. **A)** Reagentes Live & Dead (BacLight Viability kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA); **B)** Placa de vidro para visualização em CLSM; **C)** Microscópio Confocal de Varredura à Laser.

As amostras foram examinadas em CLSM (Sistema de escaneamento a laser Zess/Bio-rad Radiance 2100 montado em um microscópio Nikon E800) em magnificação de x40, fator de zoom de 1.0, resolução de pixel de 0,55 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, e resolução das imagens de 512 x 512 pixels. Dois canais simultâneos com excitação

de 488 nm e 543 nm foram utilizados para a detecção de SYTO-9 (emissão em 500-560 nm) e PI (emissão em 650 nm). Em cada disco, 9 campos de visão foram utilizados para a obtenção das imagens. Em cada campo de visão, um total de 32 imagens foram obtidas (16 camadas contendo imagens dos 2 canais) ao longo de 30µm com intervalos de 2µm entre as camadas de imagens. As imagens individuais dos biofilmes cobriam uma área de 275µm²/campo de visão. Os arquivos foram convertidos para TIFF por meio do software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As projeções das imagens foram transferidas para o software BioImage L (Chávez De Paz et al., 2009) para a análise do biovolume total (mm³), biovolume de verde (mm³) e a cobertura do substrato (%).

QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *FTSZ*

Placas de petri (90 mm de diâmetro) contendo 18 mL de TSBg foram inoculadas com uma alíquota de 2 mL da suspensão bacteriana ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). As placas foram incubadas por 72 h com a substituição do meio a cada 24 h. Após esse período de incubação o meio foi drenado e os biofilmes enxaguados com 20mL de PBS. As placas foram preenchidas com 20 mL das soluções TSBg tamponadas de acordo com o pH correspondente (pH 7, 10, 11 e 12). As placas foram incubadas por um período de até 7 dias e o meio substituído a cada 24 h. Nos períodos experimentais: inicial (biofilme de 72 h), 24 h, 48 h, 72 h, 5 dias e 7 dias os meios foram drenados, os biofilmes foram enxaguados com 20 mL PBS e coletados com auxílio de um raspador de células (Cell scraper, Fisher Scientific International Inc., Hampton, NH, USA). As amostras foram mantidas em solução de *RNAlater* (Ambion, Austin, TX, USA) em -20°C para uso futuro. Placas contendo meio TSBg sem tampão (pH 6,52) foram utilizadas como controle positivo de crescimento do biofilme e placas com TSBg sem contaminação foram utilizadas como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata em 3 ocasiões distintas.

EXTRAÇÃO DO RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A extração do RNA e a transcrição reversa foram realizadas conforme Curry et al. (2007). As amostras foram centrifugadas e o RNA later supernadante foi removido com cuidado sem desorganizar o pellet. O biofilme foi ressuspensão em 0,7 mL de PBS à 4°C, homogeneizado por sonicação (Virtis Virsonic 100 Ultrasonic cell disruptor, Gardiner, NY) usando um pulso de 30 s a 7 W, e centrifugando a 5500g à 4°C por 10 min; este passo foi realizado três vezes. O pellet foi ressuspensão em 0,75 mL do tampão NAES (50 mM acetato de sódio, 10 mM ácido etilenodiaminotetracético, e 1% dodecil sulfato sódico, pH 5,0) e misturado em *vortexado* por 1 min. Um volume igual de ácido fenol-clorofórmio (5:1), pH 4,5 (Ambion, Austin, TX) foi adicionado à suspensão e *vortexado* por 30s. O conteúdo foi transferido para um microtubo de centrifugação de 2,0 mL com tampa rosqueável contendo 0,8g esferas de vidro (0,1 mm de diâmetro, Biospec Products, Bartlesville, OK). As células foram lisadas em homogenizador Mini-bead Beater (Biospec Products, Bartlesville, Ok), em três ciclos de 40s com 1min de intervalo em gelo. A suspensão foi centrifugada em 10000g por 5min à 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi coletada e transferida para um eppendorf e uma alíquota de 0,75 mL de ácido fenol-cloroformio (5:1) foi adicionado. Os tubos foram *vortexados* por 10 s e centrifugados em 13000g por 5 min à 4°C; esse passo foi repetido mais duas vezes. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf, seguido da adição de 0,75 mL de cloroformio-álcool isoamílico (24:1). O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e centrifugado em 14000g por 5 min à 4°C. O RNA total foi precipitado utilizando 1/10 do volume de 3M acetato de sódio (pH 5,0) e 1 volume de isopropanol à -20°C *overnight*. O RNA recém extraído foi tratado enzimaticamente com DNase I (Qiagen RNeasy Mini Kit, Qiagen Sciences, Germantown, MD) de acordo com o protocolo do fabricante.

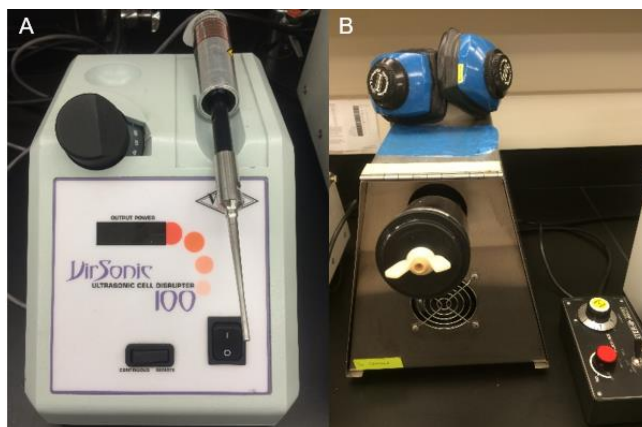


Figura 3: **A)** Sonicador (Virtis Virsonic 100 Ultrasonic cell disruptor, Gardiner, NY); **B)** Homogenizador Mini-bead Beater (Biospec Products, Bartlesville, Ok).

A transcrição reversa (RT) foi realizada por meio do iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA). Uma alíquota de 5 μ L do mRNA foi adicionada a 4 μ L de 5x iScript reaction mix, 1 μ L de iScript reverse transcriptase e 10 μ L de água livre de nuclease. A reação foi realizada em termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany): 5 min à 25°C seguido de 30 min à 42°C e 5 min à 85°C. As amostras foram armazenadas à -20°C para o uso futuro. A concentração de cDNA e sua pureza foram determinados em espectrofotômetro (NanoDrop ND-2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE), com a razão entre as absorvâncias em comprimento de onda 260 nm e 280 nm foi de aproximadamente 1,8 - 2,0. A amplificação do cDNA foi confirmada por reações de PCR: aproximadamente 75 ng de cDNA foi adicionado a 12,5 μ L de ImmoMix x2 (Bioline, Taunton, MA), 4 μ M de cada primer Ef23S e o volume de 25 μ L foi completado com água. As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial de 94°C por 10 min e à 30 ciclos de 94°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. O volume total de cada reação de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

PCR QUANTITATIVO

Para o PCR quantitativo foi utilizado o SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) no sistema DNA Engine Opticon 2 System (Bio-Rad). Baseado na concentração final de cDNA, 10 ng das amostras de cDNA foram adicionadas as reações contendo 10 μ L de SYBR Select Master Mix, 0,3125 μ M de cada primer e água para completar um volume total de reação de 20 μ L. As reações

foram submetidas a uma ativação da uracil-DNA glicosilase (UDG) por 2 min à 50°C, uma desnaturação inicial à 95°C por 2 min seguido de 40 ciclos de 10 s à 95°C e 30 s à 60°C. A curva de melting foi realizada para checar a qualidade de amplificação e assegurar a especificidade dos primers. O gene referência, 23S, foi como controle interno ao qual a expressão do gene *ftsZ* foi normalizada. As alteração nos níveis de transcritos em *fold-change* para cada pH e em todos os tempos foram determinados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os experimentos foram realizados em triplicata em três ocasiões distintas.

PRIMERS

Os primers foram sintetizados pela Invitrogen (Eugene, OR). As sequencias para o gene *ftsZ* foram: EfftsZ F: 5' CCGTCAAACAAGACAAGCGG 3' and EfftsZ R: 5' TCCCAATCGCCAAAAGCACT 3' (105 bp). As sequencias para o gene referência, 23S foram: Ef23S F, 5'- CCTATCGGCCTCGGCTTAG-3' and Ef23S R, 5'- AGCGAAAGACAGGTGAGAATCC-3' (101 bp).

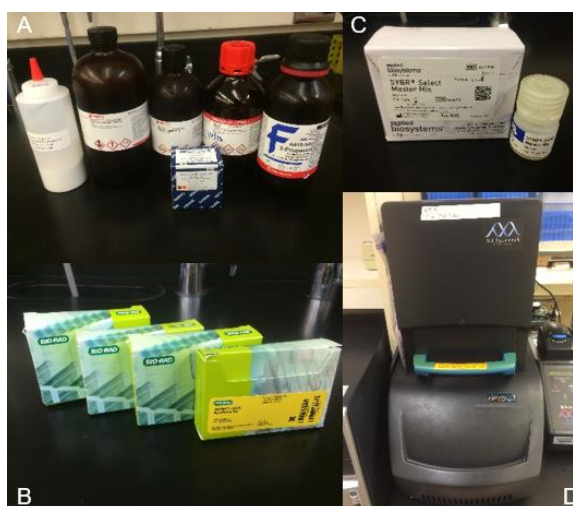


Figura 4: A) Reagentes para extração de RNA; B) iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories); C) SYBR Select Master Mix; D) sistema DNA Engine Opticon 2 System (Bio-Rad Laboratories)

ANEXO 1 – Documento para fins de comprovação de submissão do artigo

ScholarOne Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bor> **Brazilian Oral Research**[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Brazilian Oral Research

Manuscript ID BOR-2017-0007

Title Strain variation in *Enterococcus faecalis* biofilm formation when grown in different glucose concentrations

Authors Rosa, Tiago
Sedgley, Christine
Jacinto, Rogério

Date Submitted 05-Jan-2017

[Author Dashboard](#)
