

Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico

Elisabete PIVA^a, Junia de Oliveira BARBOSA^a, Rodnei Dennis ROSSONI^a,
Simone Furgeri Godinho VILELA^a, Antonio Olavo Cardoso JORGE^a, Juliana Campos JUNQUEIRA^a

^aDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

Piva E, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Interaction between *Escherichia coli* and *Candida albicans* in biofilms formed in vitro: analysis of cell viability by the colorimetric assay. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(5): 222-227.

Resumo

As interações entre fungos e bactérias estão presentes na natureza e têm grande relevância médica e ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de *Escherichia coli* sobre os biofilmes de *Candida albicans* formados in vitro. Foram desenvolvidos biofilmes heterotípicos com a associação de *C. albicans* e *E. coli* e biofilmes monotípicos de *C. albicans* (grupo controle). Foi utilizada uma suspensão padronizada de *C. albicans* contendo 10^7 células.mL⁻¹ para formação dos biofilmes. Para analisar os efeitos de *E. coli* no biofilme de *C. albicans*, foram testadas diferentes densidades celulares da suspensão de *E. coli* (10^7 , 10^6 e 10^5 células.mL⁻¹). Após 90 minutos e 24 horas da formação do biofilme, a viabilidade celular de *C. albicans* foi quantificada utilizando-se o ensaio colorimétrico XTT (2 metoxi 4 nitro 5 sulfofenil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido). Os dados foram submetidos à Análise de Variância ANOVA e ao teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0,05$). Após 90 minutos da formação do biofilme, observou-se que a viabilidade celular de *C. albicans* dos biofilmes heterotípicos foi semelhante ao monotípico. A análise de 24 horas demonstrou que a viabilidade celular de *C. albicans* foi maior no biofilme monotípico em relação aos biofilmes heterotípicos; entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre as densidades celulares de *E. coli* testadas nos biofilmes heterotípicos. Conclui-se que, dentro dos parâmetros utilizados, *E. coli* não inibiu a formação de biofilme por *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Escherichia coli*; biofilme.

Abstract

The interactions between fungi and bacteria are present in nature and has medical and environmental importance. The aim of this study was to evaluate the effects of interaction between ATCC strains *Candida albicans* and *Escherichia coli* through the study of biofilms in vitro. For this study were developed biofilms formed by the association between *C. albicans* and *E. coli* and monotypic biofilms of *C. albicans* (control group). To evaluate the effects of *E. coli* in biofilms of *C. albicans*, we tested different cell densities of *E. coli* suspension (10^7 , 10^6 and 10^5 cells.mL⁻¹). After 90 minutes and 24 hours of biofilm formation, cell viability of *C. albicans* was quantified using the XTT (2 methoxy 4 nitro 5 sulfophenyl 5 phenylamino carbonyl 2H tetrazolium hydroxide) colorimetric assay. Data were submitted to ANOVA and Tukey's test, with 5% of significance. After 90 minutes of Candidal biofilm formation, we observed that cell viability of *C. albicans* heterotypic biofilms was similar to monotypic biofilm (control group). For the analysis of 24 hours, it was found that cell viability of *C. albicans* was higher in the monotypic biofilm if compared to heterotypic biofilm, however this difference was not statistically significant. In addition, there were no statistical differences between *E. coli* different cell densities tested in heterotypic biofilms. According to the methods used, we can conclude that *E. coli* did not inhibit the biofilm formation by *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*; *Escherichia coli*; biofilm.

INTRODUÇÃO

Na natureza, a maioria dos microrganismos tem o crescimento organizado em biofilme, uma comunidade funcional complexa composta por uma ou mais espécies envolvidas numa rede polimérica extracelular e aderidas a uma superfície sólida¹. No biofilme, os microrganismos desenvolvem várias relações de cooperação, de forma sinérgica ou inibitória, que influenciam na patogenia e na saúde do paciente^{2,3}.

Estima-se que mais de 60% das infecções microbianas estejam relacionadas à formação de biofilmes⁴; por isso, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com modelos de biofilmes formados in vitro e várias técnicas de mensuração do biofilme têm sido utilizadas, incluindo: contagem de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹), análise em espectrofotômetro e teste colorimétrico do sal 2 metoxi 4 nitro 5 sulfonil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido (XTT)⁵. O método XTT mede a atividade mitocondrial, por meio da redução intracelular do sal formando um composto denominado formazan, que pode ser quantificado pela alteração de cor (laranja). Além disso, é um método simples que utiliza apenas três compostos: XTT, menadiona e solução fisiológica tampão fosfato⁵.

Nas duas últimas décadas, muitos estudos concentraram-se nas propriedades estruturais, fenotípicas e moleculares dos biofilmes formados por uma única espécie de microrganismo; porém, verificou-se a necessidade de estudos sobre as interações entre as múltiplas espécies que coexistem em harmonia nesses nichos microbianos. Interações entre microrganismos eucarióticos e procarióticos são comuns, podendo existir uma relação antagônica ou benéfica entre as espécies³. Em estudo realizado in vitro, Hogan, Kolter⁶ (2002) demonstraram uma relação antagônica na interação entre as espécies *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tampakakis et al.⁷ (2008) também observaram antagonismo na interação entre *C. albicans* e *Salmonella typhimurium*. Por outro lado, Marriot, Noverri² estudaram a interação, in vitro, entre *C. albicans* e *Staphylococcus aureus*, demonstrando sinergismo na relação entre essas espécies em modelo de biofilme heterotípico.

Na cavidade bucal e no trato gastrointestinal, enterobactérias como *Escherichia coli* e espécies do gênero *Candida* compartilham um ambiente comum. Entretanto, a interação entre esses microrganismos tem sido pouco estudada⁸.

Candida albicans é a principal espécie fúngica capaz de causar doenças em humanos, levando tanto a infecções superficiais como sistêmicas⁹. As infecções das mucosas causadas por *Candida* spp. representam um problema significativo e, muitas vezes, são de difícil tratamento por causa da alta frequência de resistência aos antifúngicos convencionais¹⁰. Até 81% dos pacientes HIV positivos podem ter cepas resistentes aos antifúngicos convencionais e 74% podem apresentar recolonização após o tratamento¹¹.

Escherichia coli, uma bactéria anaeróbia Gram-negativa, faz parte da microbiota normal do homem e de animais¹²; mas, em condições como imunossupressão, essa espécie pode causar infecções e levar à doença no trato intestinal, como a gastroenterite, ocorrendo, em alguns casos, disseminação e

colonização para o sistema nervoso central, o trato urinário e o sangue^{13,14}.

Infecções complexas envolvendo *C. albicans* e *E. coli* foram descritas como um importante fator na promoção de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados com baixa resposta imunológica^{15,16}. A taxa de mortalidade associada a esses eventos é em torno de 10 a 30%¹⁷. Nair, Samaranyake¹⁸ (1996) estudaram os efeitos de *E. coli* na fase posterior de adesão de *C. albicans* a superfícies acrílicas e células epiteliais bucais, demonstrando que, na presença de *E. coli*, *C. albicans* apresentou redução da capacidade de aderência. Por outro lado, Sedgley et al.¹⁹ (1996) demonstraram que a presença de *C. albicans* pré-aderida às superfícies sólidas não causou redução na aderência subsequente de *E. coli*.

Sendo assim, a proposição deste trabalho foi avaliar os efeitos da presença de *E. coli* no biofilme de *C. albicans* por meio da análise de viabilidade celular, utilizando-se ensaios colorimétricos do XTT.

MATERIAL E MÉTODO

1. Microrganismos

Cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram submetidas a diferentes condições experimentais para comparar o crescimento dos microrganismos em biofilmes monotípicos e heterotípicos. Os biofilmes monotípicos foram formados por suspensão padronizada de *C. albicans* contendo 10⁷ células.mL⁻¹ (grupo controle). Os biofilmes heterotípicos foram compostos por *Candida albicans* em 10⁷ células.mL⁻¹ e *Escherichia coli* em diferentes concentrações: 10⁵, 10⁶ e 10⁷ células.mL⁻¹. Foram realizados 80 ensaios experimentais, conforme demonstrado no Quadro 1.

2. Preparo da Suspensão Padronizada de Microrganismo

Para o preparo das suspensões padronizadas de *C. albicans* e *E. coli*, cada microrganismo foi cultivado, respectivamente, em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) por 24 horas a 37 °C e em ágar MacConkey por 24 horas a 37 °C. A seguir, uma alçada de *C. albicans* foi semeada em caldo Yeast Nitrogen Base (Difco, Detroit, USA) acrescido de 100 mM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Para *E. coli*, o caldo de crescimento utilizado foi o Infuso Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion* - Difco, Detroit, EUA). Ambos foram incubados por 18 horas a 37 °C.

O caldo de crescimento de cada microrganismo foi centrifugado a 2000 Xg por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). A contagem do número de células em suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda e densidade óptica, respectivamente, de 530 nm para *C. albicans* e 590 nm para *E. coli*, padronizando as densidades celulares das suspensões conforme descrito.

Quadro 1. Número de ensaios distribuídos em cada grupo experimental

Biofilmes	Densidade celular de <i>E. coli</i>	Tempo de formação do biofilme	
		90 minutos	24 horas
Monotípicos (Controle)		10	10
Heterotípicos	10^5 células.mL ⁻¹	10	10
	10^6 células.mL ⁻¹	10	10
	10^7 células.mL ⁻¹	10	10

3. Formação do Biofilme

Para a formação do biofilme de *Candida albicans*, foi utilizada a metodologia descrita por Seneviratne et al.²⁰ (2009) com algumas modificações.

Inicialmente, foram pipetados 200 µL da suspensão padronizada do microrganismo nos poços da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). A placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37 °C por 90 minutos, para fase inicial de adesão. Decorrido esse período, a suspensão de microrganismo foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com 200 µL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS), para a remoção das células não aderidas. Em seguida, foram pipetados 200 µL de Caldo YNB (Difco, Detroit, USA) acrescido de 100 mM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

Para a formação do biofilme heterogêneo, foram pipetados 100 µL de soro fetal bovino sobre o biofilme de *C. albicans* pré-formado, sendo a placa novamente incubada a 37 °C por 2 horas em agitação (Quimis, Diadema, São Paulo). A suspensão foi novamente aspirada e cada poço lavado duas vezes com 200 µL de PBS. A seguir, em cada poço da placa, foram adicionados 100 µL da suspensão padronizada de *E. coli* (10^5 , 10^6 ou 10^7 células.mL⁻¹) e 100 µL de Caldo YNB (Difco, Detroit, USA) acrescido de 100 mM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

As placas foram incubadas a 37 °C em agitação (Quimis, Diadema, São Paulo). Após 90 minutos e 24 horas de formação do biofilme, foi realizada a leitura por análise colorimétrica de XTT.

4. Ensaio Colorimétrico por XTT

Os biofilmes formados foram submetidos ao ensaio de XTT (2 metoxi 4 nitro 5 sulfonil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido), para avaliar a presença de leveduras metabolicamente ativas. A metodologia descrita foi baseada no trabalho de Jin et al.²¹ (2004).

O sal XTT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi dissolvido em solução fisiológica tampão fosfato (PBS) na concentração final de 1 mg.mL⁻¹. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA) e armazenada a -80 °C até o momento do uso.

Imediatamente antes de cada ensaio, a solução de Menadiona (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi preparada na concentração

de 0,4 mM e esterilizada por filtração. A solução XTT foi descongelada e misturada com a solução de menadiona na proporção do volume de 20:1.

Cada poço, contendo o biofilme aderido, foi lavado quatro vezes com 200 µL da solução fisiológica tampão fosfato (PBS) para remover as células fracamente aderidas. Em seguida, 158 µL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS), 40 µL de XTT e 2 µL de menadiona foram inoculados em cada um dos poços. Após a incubação no escuro por 3 horas a 37 °C, 100 µL da solução foram transferidos para uma nova placa e a mudança colorimétrica da solução foi medida utilizando-se um leitor de microplacas a 490 nm.

5. Análise Estatística

Os resultados de densidade óptica obtidos no ensaio de XTT foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, considerando-se diferença estatística quando $p < 0,05$, utilizando-se o software Minitab 14 (Inc. PA, USA).

RESULTADO

Após 90 minutos da formação inicial do biofilme, observou-se que a viabilidade celular de *C. albicans* dos biofilmes heterotípicos foi semelhante ao biofilme monotípico (grupo controle), indicando que a presença de *E. coli* nas densidades celulares de 10^5 , 10^6 e 10^7 não interferiram na adesão inicial de *C. albicans* para a formação do biofilme (Tabela 1 e Figura 1).

Para os biofilmes analisados no período de 24 horas, verificou-se que a viabilidade celular de *C. albicans* foi maior no biofilme monotípico em relação aos biofilmes heterotípicos; entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 2 e Figura 1).

DISCUSSÃO

A cavidade bucal é colonizada por cerca de mil espécies de microrganismos e a maioria deles está organizada em biofilmes²². Inúmeros artigos foram publicados acerca de biofilmes de *Candida* nas últimas duas décadas. No entanto, a maioria desses dados está baseada em monoespécies, sendo que os estudos sobre biofilmes mistos de espécies de *Candida* ou associados com bactérias ainda são escassos²³. Estudos de biofilmes mistos envolvendo bactérias e *C. albicans* demonstraram que

Tabela 1. Estatística descritiva e valor de *p* para os dados de densidade óptica obtidos nos testes de viabilidade celular de *C. albicans* nos biofilmes monotípicos e heterotípicos para o tempo de 90 minutos

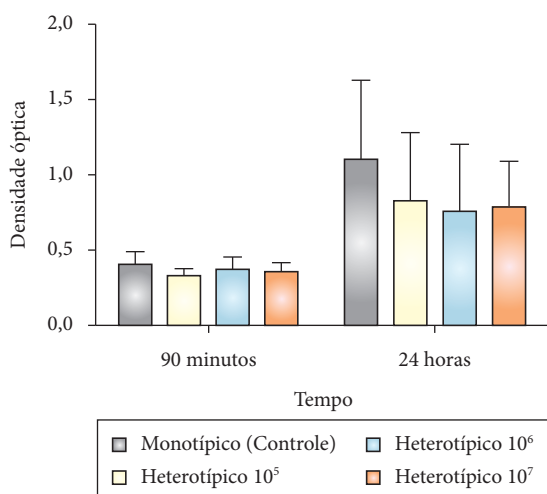
Biofilmes	Média	Desvio padrão	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	Valor de <i>p</i> *
Monotípico (controle)	0,3943	0,0906	0,4360	0,4770	0,2080	0,195
Heterotípico (10 ⁵)	0,3264	0,0417	0,3240	0,3980	0,2620	
Heterotípico (10 ⁶)	0,3696	0,0793	0,3535	0,5660	0,2880	
Heterotípico (10 ⁷)	0,3537	0,0584	0,3380	0,4620	0,2810	

*Não existe diferença estatisticamente significativa (ANOVA, *p* < 0,05).

Tabela 2. Estatística descritiva para os dados de densidade óptica obtidos nos testes de viabilidade celular de *C. albicans* nos biofilmes monotípicos e heterotípicos para o tempo de 24 horas

Biofilmes	Média	Desvio padrão	Mediana	Valor máximo	Valor mínimo	Valor de <i>p</i> *
Monotípico (controle)	1,103	0,524	1,272	1,717	0,415	0,296
Heterotípico (10 ⁵)	0,824	0,465	0,611	1,618	0,367	
Heterotípico (10 ⁶)	0,764	0,441	0,657	1,381	0,299	
Heterotípico (10 ⁷)	0,783	0,313	0,766	1,237	0,352	

*Não existe diferença estatisticamente significativa (ANOVA, *p* < 0,05).

**Figura 1.** Média e desvio padrão dos resultados de densidade óptica obtidos na viabilidade celular de *C. albicans* nos biofilmes monotípicos (grupo controle) e heterotípicos para os tempos de avaliação de 90 minutos e 24 horas.

a natureza dessas interações pode variar desde uma relação de comensalismo, de antagonismo, ou até mesmo não haver estímulo algum nessa relação²⁴. O estudo das interações microbianas em biofilmes heterotípicos é extremamente importante, tendo em vista que in vivo os biofilmes formados são normalmente mistos e que alguns microrganismos presentes, mesmo não diretamente relacionados com uma patologia, podem ter uma influência indireta na sua evolução clínica.

Muitas interações celulares entre fungos e bactérias têm sido associadas com a redução da viabilidade fúngica, que pode ser mediada pela secreção bacteriana de moléculas antifúngicas no ambiente, por transferência de toxinas diretamente no interior da célula fúngica ou por depleção de nutrientes pelas bactérias^{3,25}. Segundo El-Azizi et al.²⁶ (2004), várias bactérias podem levar

à redução de *C. albicans* em biofilme heterogêneo formado pela adição simultânea das diferentes espécies. Por outro lado, *C. albicans* pode auxiliar a adesão das bactérias aos tecidos hospedeiros. Klotz et al.²⁷ (2007) verificaram que as glicoproteínas de superfície de *C. albicans* favoreceram a formação de agregados bacterianos e, conseqüentemente, o processo de adesão às células do hospedeiro, sendo assim consideradas um importante fator de coadesão em biofilmes mistos. Peters et al.¹ (2010) também demonstraram que as bactérias possuem capacidade de aderência às células de *C. albicans*, sendo *S. aureus* a espécie bacteriana com maior capacidade de aderência às hifas de *Candida* quando comparado às espécies de *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Além disso, foi demonstrado, in vitro, que biofilmes heterotípicos formados por *C. albicans* e *S. aureus* são mais resistentes ao tratamento com vancomicina se comparados aos biofilmes formados somente por *S. aureus*, sugerindo uma relação sinérgica entre as espécies².

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da bactéria *E. coli* sobre *C. albicans* em biofilmes heterotípicos, levando-se em consideração a concentração de células de *E. coli* (10⁵ a 10⁷) adicionadas ao biofilme de *C. albicans* e o comportamento da interação microbiana em relação aos tempos de formação do biofilme (90 minutos e 24 horas). Os resultados demonstraram que apenas após 24 horas de formação do biofilme foi possível observar um discreto efeito inibitório de *E. coli* sobre o biofilme de *C. albicans*, independentemente da concentração celular de *E. coli* adicionada ao biofilme; entretanto, essa inibição não foi estatisticamente significativa.

Thein et al.⁸ (2007) também estudaram a interação entre *C. albicans* (10⁷ células.mL⁻¹) e *E. coli* (10¹ a 10⁷ células.mL⁻¹) em biofilme de 48 horas, e observaram a inibição estatisticamente significativa do crescimento de *C. albicans* em cultura mista com *E. coli*, sendo que a maior inibição foi observada quando utilizada a maior concentração da suspensão bacteriana (10⁷ células.mL⁻¹).

Outros trabalhos recentes abordando biofilmes mistos têm demonstrado a relação de antagonismo entre *C. albicans* e *E. coli*^{3,23}, sendo que a maioria desses analisou a interação microbiana por contagem de UFC.mL⁻¹. Entretanto, esse método pode resultar em subestimações do número de células viáveis, uma vez que existem dificuldades na dispersão das células nos agregados microbianos presentes nos biofilmes²⁰.

Os testes colorimétricos de viabilidade celular são importantes ferramentas no estudo da atividade das células eucarióticas. São atraentes em razão da produção de parâmetros claros, com base na observação visual da mudança de cor detectável nos componentes do teste²⁸. Bandara et al.²⁹ (2010), utilizando o ensaio colorimétrico de XTT, avaliaram biofilmes mistos de várias espécies de *Candida* associados à lipopolissacarídeos (LPS) extraídos de bactérias Gram-negativas (*E. coli*). Como no presente estudo, o biofilme também foi avaliado em diferentes fases de formação: 90 minutos, 24 e 48 horas. Em todos os tempos de observação, os autores verificaram que, para algumas espécies de *C. albicans*, o LPS estimulou o crescimento do biofilme de *C. albicans*, enquanto que, para outras espécies de *Candida*,

pôde-se observar um efeito inibitório do LPS, sugerindo que o LPS teve um efeito modulador significativo sobre os vários estágios de desenvolvimento do biofilme de *Candida*.

A interação entre *E. coli* e *C. albicans* tem sido mais estudada em modelos de formação de biofilme in vitro. Até o momento, poucos estudos foram realizados in vivo. Klaerner et al.³⁰ (1997) observaram que a inoculação simultânea de *C. albicans* e *E. coli* em camundongos elevou a taxa de mortalidade dos animais em 83,3%, quando comparadas com a taxa de cada grupo de microrganismo inoculado isoladamente, concluindo que houve uma interação de sinergismo entre os patógenos *C. albicans* e *E. coli*. Sendo assim, a partir do presente momento, estudos de interação entre *E. coli* e *C. albicans* devem ser dirigidos para modelos de candidose bucal ou sistêmica em animais experimentais.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que, dentro dos parâmetros utilizados, *E. coli* não inibiu a formação de biofilme de *C. albicans*, independentemente da concentração celular de *E. coli* adicionada ao biofilme.

REFERÊNCIAS

- Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton W, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*.2010;59:493-503. PMID:20608978. PMCID:2936118.
- Marriot MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3914-22. PMID:19564370. PMCID:2737866. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00657-09>
- Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nature Reviews*. 2010;8:340-9. PMID:20348933. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2313>
- Lewis, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45:999-1007. PMID:11257008. PMCID:90417. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EAR, Samaranyake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008;19:364-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402008000400014>
- Hogan HA and Kolter R. *Pseudomonas*-*Candida* Interactions: An ecological Role for virulence factors. *Science*. 2002;296:2229-31. PMID:12077418. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1070784>
- Tampakakis E, Peleg AY, Mylonakis E. Interaction of *Candida albicans* with an intestinal pathogen, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Eukaryotic Cell*. 2009;8:732-7. PMID:19329669. PMCID:2681611. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00016-09>
- Thein ZM, Samaranyake Y H and Samaranyake L P Oral. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms. *APMIS*. 2007; 115: 1241-51. PMID:18092956. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0643.2007.00735.x>
- Hoehamer CF, Cummings ED, Hilliard GM, Rogers PD. Changes in the Proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:1655-64. PMID:20145080. PMCID:2863685. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00756-09>
- Chabrier Roselló Y, Foster TH, Mitra S, Haidaris CG. Respiratory deficiency enhances the sensitivity *Candida* to photodynamic treatment. *Photobiol Photochem*. 2008; 84:1141-8. PMID:18248505. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00280.x>
- Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93:155-60. <http://dx.doi.org/10.1067/moe.2002.120051>
- Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2006.
- Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2008;85:11-9. PMID:18482721. PMCID:2595135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007>
- Nakazato G, Campos TA, Stehling EG, Brocchi M, Silveira WD. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Pesq Vet Bras*. 2009;29:479-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700001>
- Bakaletz, L. O.: Viral potentiation of bacterial superinfection the respiratory tract. *Trends in Microbiol*. 1995; 3:110-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88892-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88892-7)

16. Stoutenbeek, CP, Van Saene HKF, Miranda DR, Zandstra DF, Binnendijk B. The prevention of superinfection in multiple traumapatients. *J. Antimicrob. Chemother.* 1984;14:203-11.
17. Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A, Wenzel RP. Hospital-acquired interference with the leukocyte function by hemoglobin candidemia: The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med.* 1988;148: 2642. PMID:3196127. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.148.12.2642>
18. Nair RG, Samaranyake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An *in vitro* study. *APMIS* 1996;104:339-49. PMID:8703439. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1996.tb00725.x>
19. Sedgley CM, Samaranyake LP, Darvell BW. The influence of incubation conditions on the adherence of oral Enterobacteriaceae to HeLa cells. *APMIS* 1996;104:583-90. PMID:8920813. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1996.tb04915.x>
20. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2009;54:1052-60. PMID:19712926. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.08.002>
21. Jin Y, Samaranyake LP, Samaranyake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol.* 2004;49:789-98. PMID:15308423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.04.011>
22. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:412-8. <http://dx.doi.org/10.1039/b211266c>
23. Thein ZN, Seneviratne CJ, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses.* 2009;52:467-475. PMID:19486299. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01719.x>
24. Shirliff ME, Peters MB, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol.* 2009;1-8.
25. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006;51:672-80. PMID:16620775. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.02.005>
26. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol.* 2004; 96:1067-73. PMID:15078523. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02213.x>
27. Klotz SA, Gauer NK, De Armond R, Sheppard D, Khardori N, Edwards JE Jr, et al. *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol.* 2007.45:363-70.
28. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol.* 2003;41:506-8. PMID:12517908. PMID:149594. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.506-508.2003>
29. Bandara HMHN, Lam OLT, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. Bacterial lipopolysaccharides variably modulate in vitro biofilm formation of *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2010;59:1225-34. PMID:20576747. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.021832-0>
30. Klaerner HG, Uknis ME, Acton RD, Dahlberg PS, Carlone-Jambor C, Dunn DL. *Candida albicans* and *Escherichia coli* are synergistic pathogens during experimental microbial peritonitis. *J Surg Res.* 1997;70:161-5. PMID:9245566. <http://dx.doi.org/10.1006/jsre.1997.5110>

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Elisabete Piva

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
UNESP – Universidade Estadual Paulista, Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777, São Dimas,
12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil
e-mail: elisabete.piva@gmail.com

Recebido: 13/09/2011

Aceito: 17/10/2011