

**FACULDADE SETE LAGOAS**

**FERNANDA SILVA FERNANDES**

**Identificação de genes de virulência em *Enterococcus faecalis* coletados de  
infecções primárias através de métodos moleculares**

**OSASCO**

**2019**

**FERNANDA SILVA FERNANDES**

**Identificação de genes de virulência em *Enterococcus faecalis* coletados de infecções endodônticas primárias através de métodos moleculares**

Monografia apresentada à Associação Brasileira de Odontologia - ABO, Osasco, para obtenção do título de Especialista em Endodontia.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Profa. Dra. Sandra Soares Kühne Busquim

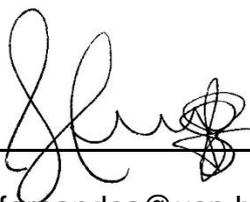
**OSASCO**

**2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

Osasco, 11 / 03 / 2019

Assinatura do Autor:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernanda Fernandes', written over a horizontal line.

e-mail do autor: [fernanda-fermandes@usp.br](mailto:fernanda-fermandes@usp.br)

## RESUMO

FERNANDES, F. S. Identificação de genes de virulência em *Enterococcus faecalis* coletados de infecções endodônticas primárias através de métodos moleculares. 2009. 38 f. [monografia de especialização]. Osasco: Associação Brasileira de Odontologia, 2019.

Sabe-se que a microbiota endodôntica é preferencialmente anaeróbia, devido às condições deste nicho e dos nutrientes disponíveis, sendo estes micro-organismos na sua maioria proteolíticos. Fatores de adesão propiciam sua instalação nas paredes do canal radicular, constituindo biofilmes, assim como proliferação dentro dos túbulos dentinários. De acordo com a literatura, cada espécie possui um gene de adesão específico, que confere essa vantagem à bactéria. O presente estudo teve como objetivo identificar três genes de adesão na espécie de micro-organismo *Enterococcus faecalis*, coletados de canais radiculares com polpas necróticas, comparando cinco isolados clínicos com a cepa ATCC 29212 e ATCC 4083. Os isolados clínicos foram adquiridos por um protocolo de coleta utilizando cones de papel absorvente, levados ao meio de cultura RTF, em seguida foi feito o isolamento através de cultura bacteriana e identificação por série bioquímica com testes comerciais (Sistema Api, Bio-Mériéux, França). Após a identificação da espécie, foi realizado o PCR convencional para identificação dos genes de adesão *esp*, *asa* e *ace*. O gene *ace* apresentou 100% de presença (5/5) nas cepas coletadas, enquanto que para o gene *asa* 60% de presença (3/5) e o gene *esp* 80% de presença (4/5). O conhecimento mais apurado do comportamento dos micro-organismos dos canais radiculares propiciará melhores modelos de estudo antimicrobianos para uso futuro, além do maior conhecimento da sua virulência.

**Palavras-chave:** Endodontia, Biologia Molecular, Fatores de Virulência, Reação em cadeia de polimerase.

## ABSTRACT

FERNANDES, F. S. Identification of virulence genes in *Enterococcus faecalis* collected from primary endodontic infections using molecular methods. 2009. 38 f. [monograph]. Osasco: Associação Brasileira de Odontologia, 2019.

It is known that the endodontic microbiota is preferably anaerobic, due to the ministries of this niche and the available nutrients, these microorganisms being mostly proteolytic. Adhesion factors favor its installation in the walls of the root canal, constituting biofilms, as well as proliferation within the dentinal tubules. According to the literature, each species has an specific gene which confers this advantage to the bacteria. The present study had the objective to identify three adhesion genes in five clinical sample of *Enterococcus faecalis* collected inside the root canal with necrotic pulps, comparing with the ATCC 29212 and ATCC 4083 samples. The clinical samples were obtained by using a protocol with absorbent paper point, then taken to a eppendorf tube contained RTF culture medium, then the isolation was made through the bacterial culture and the identification by series of biochemistry with commercial testes (Api System, Bio-Meriéux, France). After identification of the species, the conventional PCR was performed to identify the adhesion genes (esp, asa and ace). The ace gene was identified in 100% of the samples (5/5), the asa gene was detected in 60% presence (3/5) and the gene esp was identified in 80% presence (4/5). The more accurate knowledge of the behavior of the microorganisms of the root canals will provide better models of antimicrobial study for future use, besides the greater knowledge of its virulence.

Keyword: Endodontics, Molecular Biology, Virulence factors, Polimerase reaction chain

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Fernando César e Leilane, pela compreensão, paciência e dedicação durante toda a minha trajetória.

A minha irmã Etiene, por sempre me apoiar e ser parceira para todas as horas.

A minha sobrinha Beatriz, é o amor que tenho por ela que me dá força para seguir de cabeça erguida e buscando sempre o melhor.

Aos meus amigos do curso por todos os momentos incríveis e as risadas que trocamos, especialmente Aline, por ter sido uma mãe para mim durante esses dois anos, seja com uma palavra amiga ou em acolhendo em sua casa. E a Carla, por ter sido minha irmã de coração, e facilitando muito a caminhada do curso, mesmo agora estando longe.

Aos professores, Marcelo, Laila, Alessandra e Débora, pelo conhecimento que me passaram, amizade e muita paciência. No decorrer do curso, houveram muitas mudanças na minha vida e sempre tiveram empatia pela minha história, me ajudando sem medir esforços.

A minha Orientadora Sandra, que aceitou de prontidão a me orientar, sempre muito dedicada, um exemplo de mulher e profissional. Me espelho muito em você, Obrigada!

Aos funcionários da ABO, que sempre deram apoio ao meu trabalho, com elogios e muita ajuda.

A todos vocês, minha eterna gratidão!

“Eu já sei caminhar por tantas nuvens  
E posso visitar de vez em quando o chão  
Do alto do parque, por cima das árvores eu vejo você  
Em quanto os pássaros sorriem para mim  
Você procura o céu que não existe mais  
Em São Paulo cinza, no Rio vermelho, em Recife azul  
E a minha casa é para onde vão meus pés”

(A banda mais bonita da cidade - Terminei indo)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene *asa* ..... 23
- Figura 5.2 - Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene *ace* ..... 24
- Figura 5.3 - Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene *esp* ..... 24

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Identificação de espécies microbianas no canal radicular por metodologias moleculares.....	11
2.2	Genes de adesão asa, ace e esp .....	15
3	OBJETIVOS .....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Isolamento, identificação e armazenagem dos microrganismos .....	19
4.2	Espécie bacteriana <i>Enterococcus faecalis</i> .....	20
5	RESULTADOS .....	23
6	DISCUSSÃO .....	26
7	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS .....	32
	ANEXO.....	38

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento de dentes com periodontite apical crônica tem como objetivo promover a redução bacteriana, tendo em vista que estes são os agentes etiológicos da periodontite apical. As bactérias estão presentes na forma de biofilme que está aderido às paredes dos canais radiculares e no interior dos túbulos dentinários, e portanto, para reduzir a ação bacteriana é necessário desorganizar essa estrutura por meios mecânicos, deixando as bactérias mais vulneráveis à ação química dos agentes antimicrobianos. A infecção persistente após os procedimentos endodônticos pode culminar no insucesso do tratamento se essas bactérias alcançarem os tecidos periapicais em concentrações suficientes para induzir o processo inflamatório desses tecidos.

Em isolados de canais radiculares com doenças periapicais persistentes, é comumente encontrado, microrganismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, capazes de se adaptar em alterações ambientais agressivas, como o *Enterococcus faecalis*. Esse microrganismo é capaz de se aderir em superfície e túbulos dentinários para manter-se viável durante longos períodos dentro do canal radicular. Essa capacidade de adaptação e a habilidade de formar biofilme ocorre pela presença de fatores de virulência associados com a agregação e adesão ao substrato dentinário, determinados geneticamente, o que contribui para a persistência do *E. faecalis* durante o tratamento endodôntico.

Por ser o *E. faecalis* de crescimento fácil em cultura, é bastante utilizado nos testes de suscetibilidade microbiana de materiais endodônticos, devido também à sua importância patológica. Embora o método de identificação bacteriana por cultura tenha como vantagem a possibilidade de identificar espécies viáveis, essa técnica possui limitações importantes, como a baixa sensibilidade e a impossibilidade de cultivar grande número de espécies bacterianas. Conhecendo as limitações do método de cultura, métodos moleculares independentes de cultura foram propostos para determinação da diversidade microbiana em infecções endodônticas. Esses métodos possibilitaram um aumento no número de filamentos bacterianos reconhecidos nas infecções endodônticas devido a sua maior especificidade, sensibilidade e

acurácia na identificação microbiana, permitindo a detecção de espécies microbianas não cultiváveis, que correspondem a mais de 50% da microbiota dos canais radiculares.

Para identificação bacteriana por métodos moleculares, o gene alvo deve conter regiões únicas para cada espécie bacteriana. O alvo mais utilizado para esse fim é o gene 16S rRNA (rDNA). Esses dados da sequência do gene podem ser usados tanto para identificação quanto para quantificação bacteriana.

O conhecimento mais apurado do comportamento dos microrganismos dos canais radiculares propiciará melhores modelos de estudo antimicrobianos para uso futuro, além do maior conhecimento da sua virulência. Com isso, o presente estudo investigou a presença de três genes de virulência do *E. faecalis* (*esp*, *asa* e *ace*) em cepas coletadas de dentes unirradiculares com periodontite apical crônica comparando cinco isolados clínicos com a respectiva cepa ATCC 29212 (American Type Culture Collection).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Identificação de espécies microbianas no canal radicular por metodologias moleculares

Siren et al. (1997) determinaram que as bactérias entéricas não estão presentes comumente na microbiota de canais radiculares infectados, e podem entrar no canal radicular durante o tratamento endodôntico devido um isolamento inadequado do campo de trabalho, a uma infiltração pelo material restaurador temporário, ou quando um canal é deixado aberto para drenagem. Com o objetivo de estudar a relação entre os procedimentos clínicos e a presença de bactérias entéricas facultativas, os autores realizaram coletas microbiológicas dos canais radiculares durante diferentes procedimentos ao longo do tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que *Enterococcus faecalis*, outras bactérias entéricas facultativas (*Enterobacter spp.* e *Klebsiella spp.*) e *Pseudomonas spp.* foram encontradas mais frequentemente em casos onde os canais radiculares não foram selados em algum ponto do tratamento endodôntico, ou em casos com grande número de sessões. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais frequentemente isolada. Os autores enfatizaram a importância do controle da cadeia asséptica durante a terapia endodôntica no prognóstico do tratamento.

Cheung e Ho (2001) investigaram a microbiota de canais radiculares de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas. Dezoito dentes, previamente obturados com guta-percha, foram analisados, e 12 (66,7%) apresentaram crescimento bacteriano. Cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos foram os microrganismos mais frequentemente isolados, especialmente os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. *Enterococcus spp* não foram isolados nesse estudo.

Hancock et al. (2001) estudaram a composição da microbiota presente em 54 dentes com insucesso do tratamento endodôntico. O crescimento bacteriano foi detectado em 34 casos. A microbiota era composta principalmente por 1 ou 2

espécies de microrganismos predominantemente Gram-positivos (80,4%). Os gêneros mais isolados foram: *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Streptococcus*. *Candida albicans* foi detectada em 1 caso. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequente, isolada em 30% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

Rolph et al. (2001) estudaram a microbiota de canais radiculares com polpas necrosadas e com tratamento endodôntico prévio utilizando métodos moleculares e cultura. Os autores relataram que houve um maior número de resultados positivos pelo método do PCR do que pela cultura. A análise molecular de 5 casos de infecções refratárias revelou espécies dos gêneros *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella*. *Enterococcus* não foram isolados nos 5 casos estudados.

Egan et al. (2002) investigaram a ocorrência de fungos em infecções endodônticas. Fungos estavam presentes em 6/60 canais radiculares. Dos casos positivos, 2 eram dentes infectados e não tratados (de um total de 35), enquanto 4 eram casos de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais (de um total de 25).

Pinheiro et al. (2003) realizaram um estudo bacteriológico de 30 canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Os autores relataram que a microbiota era formada, em sua maioria, por monoinfecções, composta por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas, representadas pelos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*, e, em segundo plano, por bactérias anaeróbias estritas, em especial as do gênero *Peptostreptococcus*. Foram ainda isoladas bactérias dos gêneros *Actinomyces*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Gemella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e *Haemophilus*. *Candida spp.* foi isolada em 1 caso. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequente, isolada em 45,8% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

Chávez De Paz (2004) relatou a prevalência de bactérias Gram-positivas após o preparo químico-mecânico (85%), e a presença de outras espécies além dos *Enterococcus* spp., especialmente *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. Bacilos entéricos Gram-negativos, incluindo espécies de *Enterobacteriaceae* e *Klebsiella pneumoniae*

Figdor, Davies e Sundqvist (2003) demonstraram, *in vitro*, a capacidade do *Enterococcus faecalis* de suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes em um estado metabólico mínimo. Os autores demonstraram a sobrevivência de um pequeno remanescente da população de *Enterococcus faecalis* na água (por 4 meses) e em meios com nutrientes limitados (por mais de 4 meses). Essas células bacterianas foram capazes de retornar ao crescimento após a adição de nutrientes. Todos esses fatores podem contribuir para a alta prevalência desse microrganismo em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais

Siqueira e Rôças (2003) investigaram a ocorrência de *Propionibacterium propionicum* e *Actinomyces radicidentis* em infecções endodônticas primárias e persistentes pelo método do PCR. *P. propionicum* estava presente em 36% das amostras de infecções primárias, e 58% das amostras de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais. Por sua vez, *A. radicidentis* estava presente, respectivamente, em 4% e 8% das infecções endodônticas primárias e persistentes.

Siqueira e Rôças (2004) investigaram a ocorrência de 19 espécies microbianas, pela análise do PCR, em 22 amostras de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Todas as amostras foram positivas a pelo menos uma das seguintes bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* ou *Propionibacterium propionicum*. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77% dos casos. As outras espécies mais detectadas foram: *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi isolada em 9% das amostras.

Rôças, Siqueira e Santos (2004) investigaram a prevalência de *Enterococcus faecalis* em canais não tratados e em canais com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais crônicas. *Enterococcus faecalis* foi isolado em 67% (20/30) dos dentes com insucesso do tratamento endodôntico e em 18% (9/50) dos casos de infecções primárias, sendo detectado principalmente em dentes assintomáticos.

Gomes et al. (2004), realizando um estudo microbiológico de 60 canais radiculares de dentes com polpas necróticas e com tratamento endodôntico prévio associado a lesões periapicais, encontraram uma associação entre os casos de insucesso endodôntico e espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*.

Gomes et al. (2015) avaliaram o microbioma de lesões endo-perio antes e após o preparo químico-cirúrgico. Foram obtidas amostras clínicas de 15 canais radiculares com necrose pulpar e bolsas periodontais. Para a detecção bacteriana utilizou-se Next Generation Sequencing (NGS) e cultura. Bactérias foram detectadas 17 em 100% das amostras em ambos os sítios usando Next Generation Sequencing(NGS). Firmicutes foi o filo mais dominante em ambos os sítios usando os dois métodos. As espécies mais detectadas nos canais antes e após PQC foram *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra*, *Mogibacterium timidum*, *Filifactor alocis*, e *Fretibacterium fastidiosum*. As espécies bacterianas frequentemente detectadas nas bolsas periodontais antes e após PQC usando NGS foram *P. micra*, *E. faecalis*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium brachy*, *Tanerella forsythia* e *F. alocis*. O estudo permitiu concluir que a comunidade microbiana em lesões endo-perio é mais complexa do que dita em estudos prévios. É importante notar que bactérias podem sobreviver em alguns canais mesmo após o PQC. E que a similaridade da microbiota em ambos os sítios antes e após o PQC sugerem uma via de infecção entre polpa e periodonto. Na análise da microbiota por sequenciamento de nova geração, as espécies bacterianas mais detectadas após o preparo químico-cirúrgico foram: *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius/vestibularis*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Eubacterium brachy*, *Filifactor alocis* e *Fretibacterium fastidiosum*. Os filós mais frequentemente encontrados foram: *Desulfobulbus* sp oral taxon 041, *Stomatobaculum* sp oral taxon 373, *Peptostreptococcaceae* sp oral taxon 383 e

Erysipelothrichaceae sp. oral taxon 905. Esses resultados revelaram a complexidade da comunidade bacteriana persistente após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Nóbrega et al. (2016) exploraram a diversidade bacteriana de 10 canais radiculares com abscesso apical agudo utilizando análise clonal. Foram coletadas amostras de 10 pacientes submetendo-as ao isolamento de DNA bacteriano, amplificação do gene 16S rRNA, clonagem e sequenciamento. Em média 15 táxons foram identificados por canal. Um total de 689 clones foi analisado e 76 filotipos identificados, dos quais 47 (61,84%) eram espécies diferentes e 29 (38,15%) foram declarados como espécies ainda não cultiváveis ou ainda não caracterizadas. *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* e *Peptostreptococcus stomatis* foram as espécies mais frequentemente detectadas, seguidas por *Dialister invisus*, *Phocaeicola abscessus*, o clone oral Lachnospiraceae não caracterizado, *Porphyromonas* spp e *Parvimonas micra*. Oito filos foram detectados e os táxons mais frequentemente identificados pertenciam ao filo Firmicutes (43,5%), seguido por Bacteroidetes (22,5%) e Proteobacteria (13,2%). Nenhuma espécie foi detectada em todas as amostras estudadas e algumas espécies foram identificadas em apenas 18 um caso. Com esse trabalho permitiu-se concluir que a infecção endodôntica primária aguda é caracterizada por ampla diversidade bacteriana e uma alta variabilidade interindividual foi observada. Bactérias Gram-negativas anaeróbias pertencentes ao filo Firmicutes, seguido por Bacteroidetes, foram os microrganismos mais frequentemente detectados.

## **2.2 Genes de adesão asa, ace e esp**

Jett et al. (1994) fizeram um levantamento bibliográfico para avaliar a virulência enterocócica relacionada à (i) aderência aos tecidos do hospedeiro, (ii) invasão e formação de abscessos, (iii) fatores potencialmente relevantes para a modulação das respostas inflamatórias do hospedeiro e (iv) produtos secretados potencialmente tóxicos. Foram avaliados artigos que apresentavam coletas em

diversos focos, como alimentos, tecido epitelial com abscesso, bucal, trato gastrointestinal, endocardidite bacteriana e trato urinário. Foram avaliados estudos de Ilha de patogenicidade dessa espécie. Encontraram relação entre de virulência de *E. faecalis* com adesinas, como a substância de agregação (Asa) e a proteína de adesão ao colágeno (Ace). Concluíram que a substância de agregação (Asa) pode contribuir para a patogênese de infecções enterocócicas através de vários mecanismos, incluindo a formação de agregados durante a conjugação, a transferência de plasmídeos e a adesão a uma variedade de superfícies eucarióticas.

Shankar et al. (1999), reportaram que o gene *esp* é comumente encontrado em isolados de endocardites e bacteremias, mas raramente em isolados fecais. *Esp* também foi associada à formação de biofilme e colonização do trato urinário. Mostraram que *esp* era frequentemente detectado em *E. faecalis* isolados de canais de dentes com periodontites apicais persistentes após o tratamento endodôntico. A alta prevalência de *esp* entre isolados endodônticos sugere que esse gene pode ser um importante traço de virulência que participa na colonização de canais radiculares.

Shankar et al. (1999) mostraram que ao menos uma proteína encontrada na PAI, a proteína de superfície enterocócica (*esp*), foi altamente associada a isolados de *Enterococcus faecium* derivados de infecções. Essa proteína é codificada pelo gene *esp*, que está localizado na PAI e não foi descrita sua presença em nenhum outro elemento genético (McBride et al., 2009). Portanto, isolados de *E. faecalis* que contem *esp* evidenciam a presença da PAI nessas cepas. *Esp* é uma proteína encontrada tanto em *E. faecium* quanto em *E. faecalis* e é considerada um suposto fator de virulência envolvido na adesão, colonização, evasão do sistema imune e aparentemente cumpre um papel na resistência antimicrobiana.

Penas et al. (2013) investigaram a relação genética entre linhagens isoladas de infecções endodônticas e sistêmicas, bem como sua correlação com marcadores de virulência e resistência antimicrobiana. As linhagens genéticas de 40 isolados clínicos de *E. faecalis* foram determinadas por *Multilocus sequence typing* (MLST), incluindo 21 isolados endodônticos e 19 de infecções

sistêmicas. Clusters virulentos foram investigados por PCR quanto à presença dos seguintes determinantes genéticos: polimorfismo do operon da cápsula; genes da ilha de patogenicidade (*esp*, *cyl*, *gls24-like*, *nuc1*, *psaA* e *cbh*); outros genes de virulência (*ace*, *efaA*, *gelE* e *asa*); e marcadores de resistência antimicrobiana (*vanA*, *vanB*, *aac6'-aph2"*, *aph3'-IIIa*, *ant6-la*, *ermB*, *tetM*, *tetL*, *cat* e *blaZ*). A análise filogenética revelou que a maioria dos isolados de pacientes hospitalizados (63,1%) pertencia ao complexo clonal 2 (CC2), que é um cluster virulento conhecido como causador de surtos de infecções em vários países. Amostras do CC2 carregavam no mínimo 3 genes de resistência antimicrobiana e 4 genes da PAI simultaneamente. Essas amostras eram também produtoras de cápsula. Por outro lado, os isolados endodônticos eram, em sua maioria, cepas não-capsuladas e continham poucos genes de virulência e resistência antimicrobiana. Além disso, a maioria dos isolados endodônticos apresentava relação genética distante dos isolados de pacientes hospitalizados. Em particular, 42,8% dos isolados endodônticos pertenciam ao CC 25, um cluster que é frequentemente encontrado em amostras comensais e de alimentos. Por sua vez, os genes *ace* e *efaA* foram detectados em 100% dos isolados, independente da sua origem clínica; enquanto os genes *asa* e *gelE* foram detectados em sua maioria. Concluíram que *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas apresentaram um perfil genético e de virulência diferente dos clusters patogênicos de pacientes hospitalizados, provavelmente devido a especialização ao nicho de colonização conferida principalmente por regiões variáveis no genoma.

### 3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença dos genes *ace* (fator de aderência do micro-organismo), *asa* (agregação) e *esp* (adesinas de superfície) do *E. faecalis*, coletados de canais radiculares com lesão periapical primária, comparando cinco isolados clínicos com a respectiva cepa ATCC 29212 (American Type Culture Collection).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Metodologia

As coletas foram feitas de canais de dentes com necrose pulpar e lesão periapical vistas na radiografia, de pacientes **adultos** da clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Foi dado aos pacientes um termo de consentimento livre e esclarecido para que o mesmo autorizasse a realização das coletas. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da FOB-USP e aprovado com o número **0182011 (protocolo Anexo A)**.

#### 4.1 Isolamento, identificação e armazenagem dos microrganismos

Os isolados clínicos foram adquiridos por meio de coleta, isolamento e identificação por série bioquímica com teste comercial (Sistema Api, Bio-Meriéux SA, Marcy-l'Etoile, França), de acordo com metodologia descrita por Gomes, Lilley e Drucker (1996) e Ferreira et al. (2006). As coletas foram feitas de canais de dentes com necrose pulpar e lesão periapical vistas na radiografia, de pacientes **adultos** da clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP. Foi dado aos pacientes um termo de consentimento livre e esclarecido para que o mesmo autorize a realização das coletas. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da FOB-USP e aprovado com o número **0182011 (protocolo Anexo A)**.

Anteriormente a cada abertura coronária, foi realizada a descontaminação do campo operatório, sobre o isolamento absoluto, com swabs esterilizados umedecidos em água oxigenada a 30% (v/v), e depois em NaClO (hipoclorito de sódio) a 5,25% por 30 segundos cada, havendo a neutralização subsequente deste fármaco com tiosulfato de sódio a 5% (MÖLLER, 1966; PINHEIRO et al., 2003). A abertura coronária foi feita com pontas esféricas em caneta odontológica de alta rotação e irrigação com soro fisiológico esterilizado. As

coletas foram realizadas após a abertura coronária e antes da neutralização do conteúdo séptico- tóxico do canal.

Após acesso, foram colocados sucessivamente dois cones de papel absorvente esterilizados deixando cada um por 1 minuto no canal (KOBAYASHI et al., 1990) e, então levados a microtubos com 1,0 mL de fluido de transporte reduzido RTF (SYED; LOESCHE, 1972) previamente esterilizado contendo RTF (KOBAYASHI et al., 1990). Os microtubos vedados com parafilme foram levados para o laboratório de Microbiologia em jarra de anaerobiose, para não saturar as coletas com oxigênio.

Os microtubos foram introduzidos na câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, Inglaterra) a 37°C em uma atmosfera de 10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 80% de N<sub>2</sub> e agitados (Agitador MA 162-Marconi, São Paulo-SP) por 30 a 60 segundos para dispersão dos microrganismos no meio líquido. A partir deste conteúdo, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura líquido FAB (Fastidious Anaerobe Broth - IDG Ltd, Bury, Inglaterra) pré-reduzido. Das diluições 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-4</sup> foram semeados 50 µL em placas pré-reduzidas de meio de cultura específico para o micro-organismo *Enterococcus faecalis* m-Enterococcus Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As placas na câmara de anaerobiose ficaram incubadas até 24h para permitir o desenvolvimento dos micro-organismos

#### **4.2 Espécie bacteriana *Enterococcus faecalis***

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOU SP.

As amostras endodônticas foram descongeladas e homogeneizadas por agitação durante 1 minuto. A extração de DNA e RNA foi realizada com o kit de purificação *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C,

os sobrenadantes foram descartados e os precipitados (também chamados pellet) foram suspensos em solução contendo 300  $\mu$ L de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 2  $\mu$ L de Proteinase K, e incubados por 15 minutos a 65 °C. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e foram adicionados 150  $\mu$ L da solução *MPC Protein Precipitation Reagent* para precipitação proteica. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a precipitação com isopropanol. Os ácidos nucleicos totais foram suspensos em 35  $\mu$ L do tampão TE, que foram divididos em duas partes iguais. A primeira alíquota foi para análise de DNA enquanto a segunda alíquota sofreu um processo de purificação de RNA de acordo com as recomendações do fabricante (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA). As alíquotas de DNA foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento do uso.

Alíquotas de 2  $\mu$ L do DNA extraído das colônias isoladas foram amplificadas utilizando *primers* específicos para a espécie bacteriana, visando confirmar a espécie analisada.

As sequências de nucleotídeos dos genes descritos como fatores de virulência foram obtidas com o auxílio do software Gene Runner (Hastings Software). Em seguida, a especificidade desta sequência de nucleotídeos foi verificada por comparação de similaridade no banco de dados do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information) no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, para a obtenção dos *primers*.

Tabela 4.1 - Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para confirmação dos genes de virulência de *Enterococcus faecalis*

<b>Genes</b>	<b>Pares de primers (5'-3')</b>	<b>Comprimento do fragmento amplificado em pares de bases (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>Ace</i>	GGAATGACCGAGAACGATGGC GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG	616	Creti et al. (2004)
<i>Asa</i>	CCAGCCAACACTATGGCGGAATC CCTGTCGCAAGATCGACTGTA	529	Creti et al. (2004)
<i>Esp</i>	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGA	932	Shankar et al. (1999)

Foi utilizado um aparelho termociclador para a amplificação do DNA, seguindo os protocolos de temperatura segundo os estudos de Sedgley et al. (2005), Baumgartner et al. (2004) e Matsuki et al. (1999).

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, e visualizados sob luz ultravioleta (UV). As reações foram consideradas positivas na presença de bandas de tamanho molecular apropriado (138 bp).

## 5 RESULTADOS

Após a extração de DNA das cepas coletadas e as ATCC 29212 e ATCC 4083, seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio para visualização sobre emissão de luz UV e fotografados no sistema PHOTO PC 3100Z (EPSON, Hemel Hempstead, Inglaterra). (Figuras 5.1 a 5.3).

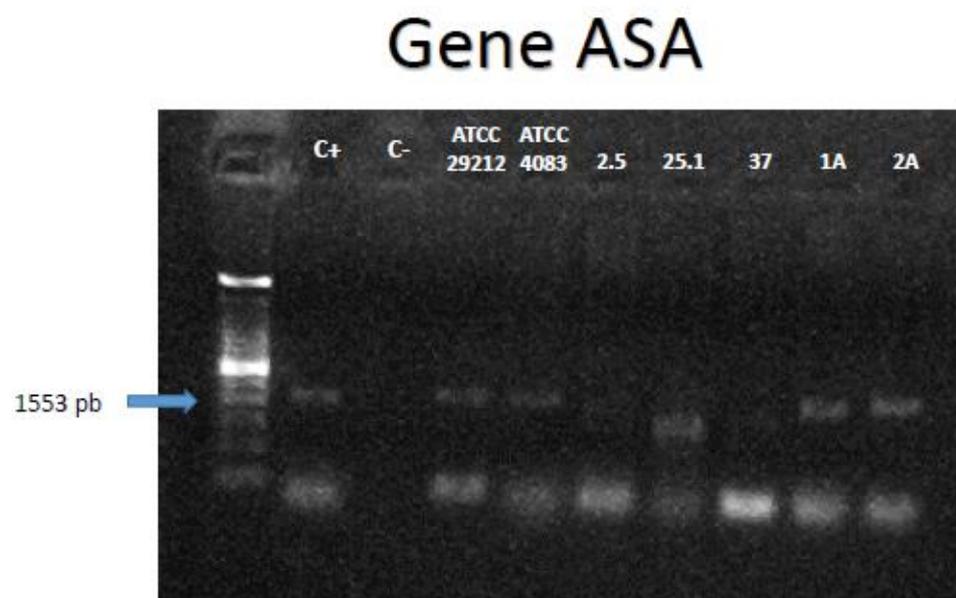


Figura 5.1 – Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene *asa*

## Gene ACE

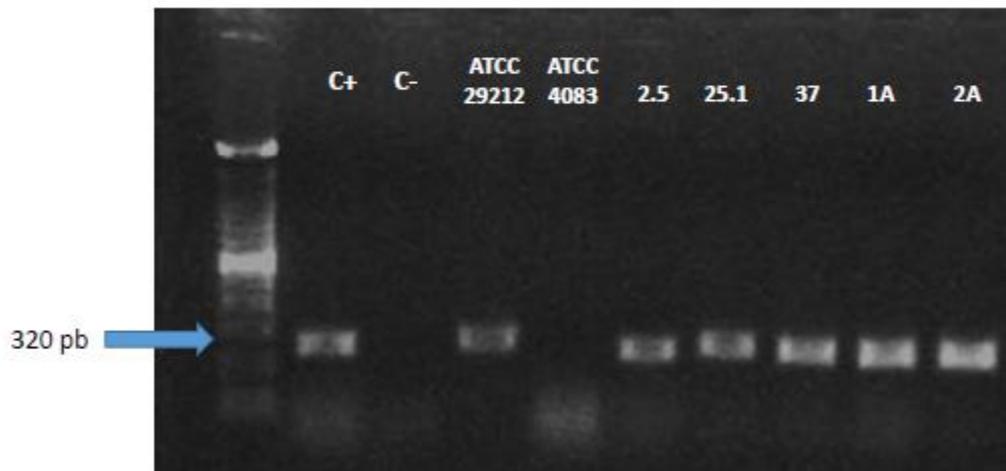


Figura 5.2 – Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene *ace*

## Gene ESP

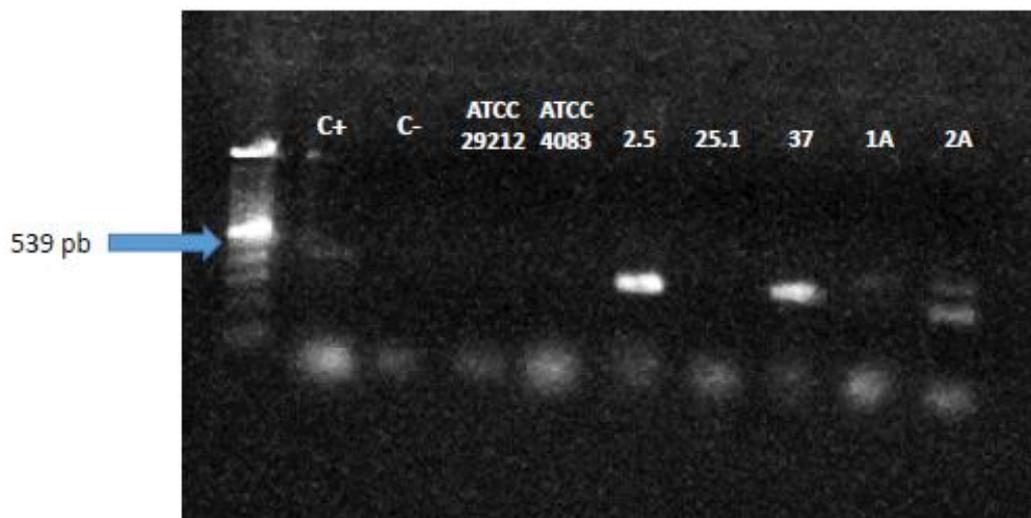


Figura 5.3 – Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene *esp*

Tabela 5.1 - Presença ou ausência dos genes estudados nas cepas de *Enterococcus faecalis*

<b>Genes</b>	<b>ATCC 29212</b>	<b>ATCC 4083</b>	<b>2.5</b>	<b>25.1</b>	<b>37</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>
<i>Ace</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>Asa</i>	+	-	-	-	-	+	+
<i>Esp</i>	-	-	+	-	+	+	+

Observou-se que apesar das cepas 2.5, 25.1 e 37 (Tabela 5.1) serem anteriormente identificadas como *Enterococcus faecalis* por PCR com o gene 16S, estas não evidenciaram a presença do gene *asa*. Enquanto que para a o gene *ace*, somente a cepa ATCC 4083 não evidenciou a presença. E para o gene *esp*, observou-se que somente as cepas 2.5, 37, 1A e 2A.

O gene *ace* apresentou 100% de presença (5/5) nas cepas coletadas, enquanto que para o gene *asa* 60% de presença (3/5) e o gene *esp* 80% de presença (4/5).

## 6 DISCUSSÃO

O maior conhecimento da microbiota endodôntica pode elucidar mecanismos patológicos das doenças relacionadas aos canais radiculares e direcionar as melhores condutas de tratamento. Sabe-se que os micro-organismos estão associados em forma de biofilme aderidos às paredes dos canais e a simulação dos mesmos pode contribuir para esse maior conhecimento.

A seleção das espécies bacterianas para o estudo é baseada na prevalência das mesmas no interior dos canais radiculares e da importância com relação à sua virulência.

A escolha do micro-organismo *Enterococcus faecalis*, se deu pela alta prevalência da mesma, já citada em diversos estudos com coletas realizadas em retratamentos endodônticos. No entanto, não há trabalhos conclusivos se essa bactéria está presente desde o início da infecção e persiste mesmo após o tratamento, ou se podemos, por meio iatrogênicos, acidentais ou por resistência da resposta do hospedeiro, carregar essa bactéria para dentro do canal.

A microbiota envolvida nas necroses pulpares e abscessos apicais é mista e dominada por bactérias anaeróbias (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009). O interior dos canais radiculares possui condições específicas que favorecem o crescimento de certas espécies microbianas (MÖLLER et al., 1981; SUNDQVIST, 1992). Pela dificuldade da cultura de microrganismos sensíveis e de crescimento lento, a biologia molecular tem ajudado bastante na identificação de micro-organismos não cultiváveis. Segundo Siqueira e Rôças (2009), nos abscessos endodônticos, 40% das espécies encontradas por biologia molecular são de filotipos não cultiváveis.

No entanto, os mesmos autores encontraram que muitas espécies cultiváveis estavam entre as mais frequentes detectadas pela metodologia do “checkerboard” (biologia molecular) em casos de abscessos apicais agudos. As espécies mais prevalentes eram *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Porphyromonas endodontalis*. Estudos anteriores envolvendo apenas cultura

isolaram estas espécies dos abscessos endodônticos (WINKELHOFF; CARLEE GRAAFF, 1985, SUNDQVIST, 1992, GOMES et al., 1996, FERREIRA et al., 2006), mas estudos moleculares também as detectaram em alta prevalência (SAKAMOTO et al., 2006; BLOME et al., 2008; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009; MONTAGNER et al., 2010), embora Munson et al. (2002), considerem que nas técnicas moleculares é possível detectar uma diversidade maior de espécies.

Estudo de Gomes et al. (2004) relata a associação da característica desenvolvimento de edema à presença dos Gram-negativos *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas* spp. e dos Gram-positivos *Gemella morbillorum*, *Peptostreptococcus micros* e *Enterococcus faecalis*.

A bactéria, frequentemente encontrada em isolados de canais radiculares, inclusive em com doenças periapicais persistentes, é *Enterococcus faecalis* (ROÇAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004). É um micro-organismo Gram-positivo, anaeróbio e capaz de se adaptar em alterações ambientais agressivas. Capaz de se aderir em superfície dentinária, túbulos dentinários e de manter-se viável durante longos períodos dentro do canal radicular (SUNDQVIST et al., 1998; LOVE, JENKINSON, 2002; CHIVATXARANUKUL et al., 2008; ARIAS-MOLIZ et al., 2009; BASMACI et al., 2013).

Quando medidas de desinfecção dos canais radiculares durante o tratamento não são efetivas o bastante, muitas espécies são eliminadas e as mais resistentes se beneficiam, proliferando e ocupando todo o espaço. O microrganismo mais frequentemente detectado no retratamento endodôntico é o *Enterococcus faecalis* (SUNDQVIST et al., 1998; MOLANDER et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003), um coco facultativo Gram-positivo, capaz de proliferar nos túbulos dentinários sem associar-se a outras espécies (SUNDQVIST et al., 1998). Esta bactéria possui fatores de virulência associados com a agregação e adesão ao substrato dentinário, determinados geneticamente (DELBONI, 2009). Por ser de crescimento fácil em cultura, é bastante utilizado nos testes de suscetibilidade microbiana de materiais endodônticos, devido também à sua importância patológica (ÖRSTAVIK; HAAPASALO, 1990; FERRAZ et al., 2001; ZEHNDER et al., 2002; FERREIRA

et al., 2007; VIANNA; GOMES, 2009; MERCADE et al., 2009; RETAMOZO et al., 2010).

Normalmente, os estudos em microbiologia endodôntica focam na identificação das espécies encontradas nos canais radiculares, encontrando o predomínio de bactérias anaeróbias ou focam em experimentos antimicrobianos utilizando micro-organismos facultativos por possuírem um cultivo mais fácil e executável. O comportamento dos microrganismos anaeróbios dos canais radiculares não tem sido muito descrito.

Reconhecendo o ambiente anaeróbio do sistema de canais radiculares, o fato de que o espessamento de biofilmes leva também à anaerobiose e que, a limitação de oxigênio pode aumentar a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, estudos adicionais são necessários para verificar a suscetibilidade antimicrobiana de biofilmes cultivados em condições anaeróbias (DUNAVANT et al., 2006). Sabe-se que a idade e a maturidade de um biofilme influênciam a tolerância aos agentes antimicrobianos, então um biofilme que cresce por um longo período - característica dos anaeróbios - deve ser avaliado. Segundo os mesmos autores, *Enterococcus faecalis* se multiplica rapidamente nas formas planctônicas ou em biofilme, mas um ambiente anaeróbio provavelmente simularia melhor as condições dos canais radiculares *in vivo*.

Existem pelo menos quatro mecanismos elucidados que conferem resistência às células que vivem em biofilmes (DUNAVANT et al., 2006): 1) O primeiro seria a barreira de matriz extracelular, impedindo a entrada de antimicrobianos; 2) estas células multiplicam mais devagar do que as planctônicas, pela própria depleção de nutrientes, que as força a permanecerem em um estado estacionário ou dormente, tendo como consequência a entrada de antimicrobianos de modo também mais lento; 3) o metabolismo é todo alterado, como por exemplo, a diminuição de oxigênio, promovendo nichos totalmente anaeróbios em profundidade; e 4) se forma uma sub-população de micro-organismos persistentes, que eram apenas uma pequena fração dos micro-organismos originais neste sítio, mas depois, pela seleção, se constituem em uma população em um estado fenotípico altamente resistente à ação dos agentes antimicrobianos.

A utilização da biologia molecular pode esclarecer mecanismos de patogenicidade de diferentes micro-organismos através da investigação dos seus genes e tem sido bastante utilizado principalmente em trabalhos na Cariologia com *Streptococcus mutans* (RODRIGUES et al., 2008; PIERALISI et al., 2010).

A persistência dos *E. faecalis* em canais radiculares tratados endodonticamente pode estar associada à presença de alguns determinantes virulentos. Alguns estudos já mostraram que *E. faecalis* isolados possuem potenciais fatores de virulência (SEDGLEY et al., 2005; REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2007; DELBONI, 2009). *Primers* para fatores de virulência, tais como, substâncias de agregação (*asa* e *asa373*), adesinas de superfície (*esp*), ativador de citolisinas (*cyIA*), gelatinase (*geIE*), antígeno da endocardite (*efaA*), antígeno do colágeno (*ace*) já foram previamente estudados (SEDGLEY et al., 2005; REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2007; DELBONI, 2009).

Delboni (2009) observou que em 74 cepas de *E. faecalis*, isoladas clínicas de humanos, houve resultado positivo para a maioria dos determinantes virulentos testados, com exceção dos fatores, *asa373* e *cyIA*, os quais não foram detectados em nenhuma cepa. Os fatores de virulência *ace* e *geIE* foram detectados em 100% das colônias, *efaA* em 92%, *esp* em 84% e *asa* em 70%. Estes resultados corroboram o estudo de Sedgley et al. (2005) que detectaram os fatores *asa*, *ace*, *efaA* e *geIE* em 100% das amostras, o gene *esp* estava presente em 61% e o *cyIA* em 18%, no entanto, o gene *asa373* não foi detectado em nenhuma amostra.

A alta prevalência de fatores de virulência em cepas de *E. faecalis* também foi relatada por Reynaud af Geijersstam et al. (2007) que analisaram as amostras bacterianas isoladas de lituanos e finlandeses e detectaram determinantes virulentos e suas proporções como *esp* (26%), citolisina (15%), *ace* (95%), *efaA* (100%), *geIE* (72%) e produção de gelatinase (47%).

Adesinas de superfície encontradas em enterococos e *ace* (adesina do colágeno do enterococo) foram prevalentes no trabalho de Delboni (2009). O gene *ace* também pode facilitar a adesão do *E. faecalis* à dentina (HUBBLE et al., 2003). Já a presença do gene *esp* foi associada com a colonização e a

persistência dos *E. faecalis* nas infecções do trato urinário em ratos (SHANKAR et al.,1999).

A pesquisa da presença destes fatores de virulência no genótipo desta espécie frequentemente isolada dos canais radiculares pode esclarecer como esta bactéria desenvolve sua resistência e, a interferência de procedimentos clínicos nestes fatores pode contribuir com melhorias no prognóstico dos retratamentos.

## 7 CONCLUSÃO

Podemos concluir que *Enterococcus faecalis* encontrados em lesões primárias apresentam os genes em questão (*asa*, *ace* e *esp*). Serão necessários mais estudos para relacionar a expressão desses genes com a presença persistente desse micro-organismo em casos de retratamento.

## REFERÊNCIAS

ARIAS-MOLIZ, M. T. et al. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. **Journal of Endodontic**, v. 35, n. 5, p. 711-714, 2009.

BAUMGARTNER, J. C. et al. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontic**,

CHÁVEZ DE PAZ L. E.; MOLANDER, A.; DAHLÉN, G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 9, p. 579-587, 2004.

CHEUNG, G. S.; HO, M. W. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, n. 6, p. 332-337, 2001.

BASMACI, F.; OZTAN, M. D.; KIYAN, M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing E. faecalis within root canals. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 9, p. 823-830, 2013.

BLOME, B. et al. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 5, p. 384-390, 2008.

CHIVATXARANUKUL, P. et al. Dentinal tubule invasion and adherence by Enterococcus faecalis. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 10, p. 873-882, 2008.

Creti, R. et al. Survey for virulence determinants among Enterococcus faecalis isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p. 13-20, 2004.

DELBONI, M. G. Identificação dos micro-organismos presentes na saliva, na coroa dental e no canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico e análise da suscetibilidade antimicrobiana, dos fatores de virulência e da diversidade genética dos Enterococcus faecalis isolados. 2009. 165 p. Tese - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

DUNAVANT, T. R. et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Endodontic**, v. 32, n. 6, p. 527-531, 2006.

EGAN, M. W. et al. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.35, n. 4, p. 321-329, 2002.

FERRAZ, C. C. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontic**,

FERREIRA, F. B. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 104, n. 5, p. 709-716, 2007.

FERREIRA, F. B. et al. Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, n. 4, p. 564-570, 2006.

FIGDOR, D.; DAVIES JK.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 4, p. 234-239, 2003.

GOMES, B. P.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. **International Endodontic Journal**,

GOMES, B. P. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiology and Immunology**,

GOMES, B. P. et al. Microbiomes of endodontic-periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. **Journal of Endodontic**, v. 41, n. 12, p. 1975-1984, 2015.

HANCOCK, H. H 3rd et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 91, n. 5, p. 579-586, 2001.

HUBBLE, T. S. et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 2, p. 121-126, 2003.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

KOBAYASHI, T. et al. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 23, n. 2, p. 100-106, 1990.

LOVE, R. M.; JENKINSON, H. F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, v. 2, p. 171-183,

MATSUKI, T, et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 506-512, 1999.

MCBRIDE, S. M. et al. Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3392-3402, 2009.

MERCADE, M. et al. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 107, n. 2, p. 295-298, 2009.

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 1998.

MÖLLER, A. J. R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. **Odontologisk Tidskrift**, v.74, suppl., p. 1-380, 1966.

MÖLLER, A. J. R. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.89, p.475-484, 1981.

MONTAGNER, F.; GOMES, B. P.; KUMAR, P. S. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. **Journal of Endodontic**,

MUNSON, M. A. et al. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **Journal Dental Research**. v. 81, n. 11, p. 761-766, 2002. Erratum in: **Journal Dental Research**. v. 82, n. 3, p. 247, 2003.

NÓBREGA, L. M. et al. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. e 103, 2016.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endodontics Dental Traumatology**, v. 6, n. 4, p. 142-149, 1990.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 10, p. 593-595, 2000.

PENAS, P. P, et al. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. **Journal of Endodontics**, v. 39, n.7, p. 858-864, 2013.

PIERALISI, F. J. S. et al. Genotypic Diversity of *Streptococcus mutans* in Caries-Free and Caries-Active Preschool Children. **International Journal of Dental**, 2010; 2010:824976.

PINHEIRO, E. T. et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 2, p. 100-103, 2003.

RETAMOZO, B. et al. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**. v. 36, n. 3, p. 520-523, 2010.

REYNAUD af GEIJERSSTAM, A. et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 2, p. 87-94, 2007.

ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA, JF, Jr., SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 313-320, 2004.

RODRIGUES, M. R. et al. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. **Ciencia Odontologica Brasileira**, v. 11, p. 40-46, 2008.

ROLPH, H. J. et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 9, p. 3282-3289, 2001.

SAKAMOTO, M. et al. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiology and Immunology**

SEDGLEY, C. M. et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. **Oral Microbiology and Immunology**. v. 20, n.1, p. 10-19, 2005.

SHANKAR, V. et al. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SIQUEIRA, J. F.; ROÇAS, I. N. The Microbiota of Acute Apical Abscesses. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 1, p.61-65, 2009.

SIQUEIRA, J. F.; ROÇAS, I. N. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 96, n. 2, p. 215-222, 2003.

SIQUEIRA, J. F.; ROÇAS, I. N. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA-directed multiplex PCR. **Journal of Endodontics**, v. 30, n.12, p. 851-854, 2004.

SIREN, E. K. et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **International Endodontic Journal**, v. 30, n. 2, p. 91-95, 1997.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **Journal of Endodontics**, v.18, n.9, p. 427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 85, n.1, p. 86-93, 1998.

SYED, S. A.; LOESCHE, W. J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 638-644, 1972.

Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**

WINKELHOFF, A. J.; CARLEE, A. W.; GRAAFF, J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. **Infection and Immunity**, v.49, n.3, p. 494-497, 1985.

ZEHNDER, M. et al. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 94, n. 6, p. 756-762, 2002.

## ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Comitê de Ética em Pesquisa**

**Proc. N° 018/2011**

---

**Título do Projeto:** *Fatores de Adesão e Biofilmes gerados por microrganismos isolados de canais radiculares*

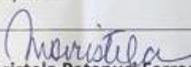
**Autor(es):** Profª Drª Flaviana Bombarda de Andrade

**Orientador(a):**  
**Co-orientador(a)**

**Data de entrega do Relatório Final:** 19/12/2018

**Data da reunião do CEP em que o Parecer Final será analisado:** 13/02/2019

---

  
Maristela Petenuci Ferrari  
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa