UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FERNANDA SILVA FERNANDES

***Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias:
Prevalência, fatores de virulência e suscetibilidade aos
procedimentos endodônticos**

BAURU
2019

FERNANDA SILVA FERNANDES

***Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias:
Prevalência, fatores de virulência e suscetibilidade aos
procedimentos endodônticos**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Co-orientadora: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

Versão Corrigida

BAURU

2019

Fernandes, Silva Fernandes

Enterococcus faecalis em infecções endodônticas primárias: Prevalência, fatores de virulência e suscetibilidade aos procedimentos endodônticos / Fernanda Silva Fernandes. – Bauru, 2019.
107p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Nota: a versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Seres
Humanos da FOB-USP
Processo: **0182011**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Silva Fernandes

DADOS CURRICULARES

25 de junho de 1991

Nascimento

Ribeirão Preto - SP

Filiação

Fernando César Nonato Fernandes

Leilane da Silva Fernandes

2009 - 2012

Bacharel em Odontologia Universidade de
Ribeirão Preto

2013 - 2015

Pós-graduação, mestrado, área
Endodontia, Universidade de Ribeirão
Preto

2015-2019

Pós-graduação, doutorado, área
Endodontia Faculdade de Odontologia de
Bauru Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Fernando e Leilane**, que sempre me ensinaram a ter paciência, força de vontade, dedicação e por acreditarem em mim.

A minha irmã **Etiene**, pelo apoio e companheirismo, essenciais para me fortalecer quando a caminhada se tornava difícil e principalmente por me dar o presente mais maravilhoso do mundo, a minha afilhada **Beatriz**. Estaremos sempre juntas!

À toda a minha família, em especial à minha avó **Maria de Lourdes**, por seu amor e dedicação à toda a família. Sua doçura torna nossos dias mais leves e cheios de felicidade.

À Família Coelho, por terem me acolhido de braços abertos, me receberam como Filha, em um momento onde eu mais precisei de todo esse carinho, amor e afeto.

A todos os meus amigos de Ribeirão Preto e São Paulo, especialmente **Fabianna Garatini** que desde a graduação esteve lá por mim, perto ou longe, sempre soube o que dizer na hora certa. E **Vivian Narana** sempre muito parceira e com uma amizade genuína. E **Straus Tanaka**, que entrou na minha vida no meio de todos os acontecimentos e ganhou um espaço muito especial em minha vida.

Obrigada por me ensinaram o verdadeiro significado de ser Família.

Os amigos são irmãos que a vida nos permite escolher. Alguns estão sempre perto, outros distantes, mas cada um faz parte da minha história e estão marcados na minha memória.

A todos vocês minha eterna gratidão e amor!

AGRADECIMENTOS

À Deus, a origem de todas as minhas forças, nessa caminhada aprendi a ter fé, saindo da zona de conforto e evoluindo sem me revoltar contra Ele.

À minha orientadora Profa. Dra. **Flaviana Bombarda de Andrade** por ter me apresentado a pesquisa em microbiologia, fazendo eu descobrir uma nova paixão em minha carreira.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. **Ericka Tavares Pinheiro** pela paciência, ensinamentos, amizade, dedicação e pela confiança.

Ao Prof. Dr. **Marco Antonio Hungaro Duarte**, Prof. Dr. **Clovis Monteiro Bramante**, Prof. Dr. **Rodrigo Ricci Vivan**, Prof. Dr. **Roberto Brandão Garcia**, por estarem sempre dispostos a ajudar e participar na minha formação.

E especialmente ao Prof. Dr. **Ivaldo Gomes de Moraes (In memoria)** desde o meu ingresso ao departamento de Endodontia trouxe ânimo e entusiasmo para que eu pudesse prosseguir na pesquisa e aprendizado em Endodontia e para a vida, um ser humano incrível com um coração Imenso. Admiro cada um pela sua singularidade, Obrigada!

Aos funcionários do departamento de Endodontia da FOB-USP. Obrigada pela convivência e amizade, e por estarem prontos a ajudar sempre que necessário.

A todos os **professores e funcionários do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de São Paulo (FOUSP)**, em especial a Profa. Dra. **Carla Sipert** pela amizade e empatia, e a **Profa Mary Caroline (Maine) Skelton-Macedo**, por acreditar em minha capacidade, sempre cheia de ternura e muito amor em cada palavra que direcionou a mim.

A vocês, minha eterna Gratidão!

Aos colegas do departamento de Endodontia da FOB/USP, **Clarissa Telles, Rafaela Fernandes, Marina Marciano, Paloma Minotti, Mariana Borges, Jussaro Duque, Bruno Piazza, Renan Furlan, Lincoln Fruchi, Samuel Lucas, Vanessa Marques, Victor Cruz, Marcelo Pomini, Ericke Mucke, Arthur Lemos e Melissa Rivera**. Obrigada pela convivência, pelas risadas e por todos os momentos juntos ao longo destes anos.

Especialmente para o **Murilo Alcade, Lyz Cristina, Clarissa Telles, Raquel Midená, Rafael “Poma” e Maricel Cuellar**, pela amizade, sinceridade e principalmente por tornar minhas viagens a Bauru melhores e acolhedoras, eu não teria conseguido sem vocês.

Aos amigos e colegas do departamento de Dentística da FOUSP, **Alexandre Pinheiro Lima Carvalho, Carlos Nogales, Claudia Caroline Bosio Meneses, Fernanda Pinheiro Bruno, Lais C. Prado, Laís Pizzatto, Luiza Paz, Marco André Craveiro, Roberto Romero, Sandra Kuhne, Ítallo Emídio, Giovanni**, obrigada pelo companheirismo, amizade, por me deixar fazer parte da história de vocês e contribuírem sempre com meu crescimento nesses últimos 3 anos.

Agradeço pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa Diretora Profa. Dra. **Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À Comissão de Pós-graduação na pessoa do Prof. **Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

Ao Coordenador do programa de Pós-graduação em Endodontia Prof. Dr. **Marco Antonio Hungaro Duarte**.

Às funcionárias da Pós-Graduação **Ana Letícia Palombo Momesso, Fátima Cassador Carvalho e Leila Regina da Silva Yerga Sanches** por sempre estarem dispostas a atender e ajudar.

À funcionária do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP **Maristela Petenuci Ferrari** pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa do Professor Dr. **Rodrigo Cardoso de Oliveira**.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, que participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

“Mas pouco sabemos até experimentarmos o quanto de incontrolável há em nós, instando-nos a atravessar geleiras e torrentes e subir a alturas perigosas, por mais que o juízo proíba. “

Alex Supertramp

RESUMO

***Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias: Prevalência, fatores de virulência e suscetibilidade aos procedimentos endodônticos**

O presente estudo teve como objetivo investigar a presença e a expressão de genes de virulência (*ace*, *asa* *esp*) de 5 cepas isoladas de canais radiculares com infecção primária, cultivados em formas planctônicas ou em biofilme, comparando os isolados clínicos com a cepa ATCC 29212 (1º experimento). Também avaliar a quantidade e a atividade metabólica de bactérias em canais radiculares com infecção primária utilizando métodos moleculares baseados na detecção de rDNA e rRNA durante o tratamento endodôntico (2º experimento). No 1º experimento, o isolamento das cepas foi realizado por série bioquímica e a identificação dos genes foi realizada através de reação de PCR convencional. Foram constituídos biofilmes mensurados quanto ao volume por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e comparados com a expressão gênica por meio de extração de RNA, transcrição em cDNA e PCR em tempo real (qPCR) das cepas cultivadas em biofilme ou na forma planctônica. No 2º experimento, amostras microbiológicas de 22 canais radiculares foram coletadas após a abertura coronária (S1), após o preparo biomecânico (S2) e após medicação intracanal por 14 dias (S3). As amostras dos canais radiculares foram submetidas à extração de DNA e RNA. O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa para confecção de DNA complementar (cDNA). DNA e cDNA foram submetidos a reações de qPCR utilizando iniciadores complementares à sequência de 16S rRNA de *E. faecalis*. O efeito dos procedimentos endodônticos na redução bacteriana foi determinado por qPCR baseada em rDNA. A atividade metabólica bacteriana foi calculada pela razão rRNA/rDNA baseados nos dados dos ensaios de qPCR.

A cepa 25.1 produziu o biofilme menos denso, sendo diferente estatisticamente das demais cepas, coincidindo com a ausência de dois genes de adesão. A cepa 37, seguida da 2.5 produziram biofilmes mais densos. A expressão dos genes *ace* e *asa* não foi diferente nas formas planctônicas ou de biofilme. No entanto, o gene *esp* foi mais expresso quando as bactérias estavam em forma de biofilme. *E. faecalis* foi detectado em 10% (3/30) e 43,4% (13/30) das amostras S1

utilizando qPCR baseado em rDNA e rRNA, respectivamente. Nas amostras S2 e S3 em 3,4% (1/30) das amostras pelo método baseado em rDNA e em 20% (6/30) pelo método baseado em rRNA. A taxa de detecção de *E. faecalis* foi maior pelo método baseado em rRNA quando comparado ao de rDNA nas amostras iniciais (S1). Na comparação entre as amostras, não houve redução significativa do número de cópias de rDNA entre S1 e S2 ($P = 0,10$), S2 e S3 ($P = 0,65$) e S1 e S3 ($P = 0,15$). Da mesma forma, os níveis de rRNA não sofreram mudanças significativas em S2 ($P = 0,25$) quando comparados às amostras S1, nem em S3 ($P = 0,46$) quando comparados às amostras S2. Baseados nesses achados, concluiu-se que existem variações na presença de fatores de adesão/coagregação nas cepas da mesma espécie, podendo estar relacionados entre si para maior virulência. Dos genes estudados, o *esp* parece estar relacionado com maior biovolume de biofilme, uma vez que sua expressão aumenta nesta condição. Concluiu-se também que o ensaio de qPCR baseado em rRNA revelou uma alta prevalência de *E. faecalis* nas infecções endodônticas primárias e que este permaneceu metabolicamente ativo nos canais radiculares após o preparo biomecânico e medicação intracanal.

Palavras-chave: Biofilmes, Endodontia, Biologia Molecular, PCR Real-Time.

ABSTRACT

***Enterococcus faecalis* in primary endodontic infections: Prevalence, virulence factors and susceptibility to the endodontic procedures.**

The present study investigated the gene expression of adhesion/coaggregation factors (*asa*, *ace* and *esp* genes) of the *Enterococcus faecalis* species in planktonic or biofilm forms obtained from root canals with necrotic pulps and periapical lesions was evaluated by comparing five clinical isolates with the ATCC reference strain 29212 (1st experiment). Also, to evaluate the quantity and the metabolic activity of bacteria in root canals with primary infections using molecular methods based on detection of rDNA and rRNA during the endodontic treatment (2nd experiment). At the first experiment, the strains were acquired from primary endodontic infections through collection, isolation and biochemical and molecular identification of this species. The biofilms were prepared on dentin disks for 7 days, stained with LIVE/DEAD™ stain and evaluated by laser scanning confocal microscopy (MCVL) for its biovolume. The RNA of strains cultured in biofilm or planktonic form was extracted, transcribed for cDNA and the polymerase chain reaction was carried out in real time (qPCR), thus obtaining the expression of the 3 genes surveyed. BioImageL software was used to evaluate the biovolume in μm^3 of biofilms. At the 2nd experiment, microbiological samples of 22 root canals were collected after coronal opening (S1), after biochemical preparation (S2) and after intracanal medication for 14 days (S3). The samples were submitted to the DNA and RNA extraction. The RNA was submitted to the reverse transcription reaction to construct the complementary DNA (cDNA). DNA and cDNA were submitted to the reactions of qPCR using complementary starters to the sequence of 16S rRNA of *E. faecalis*. The effect of endodontic procedures at the bacterial reduction was determined by qPCR based on rDNA. The bacterial metabolic activity was calculated by the ratio rRNA/rDNA, based on data of qPCR essays.

Strain 25.1 produced less dense biofilm, being statistically different from the others. Strain 37, followed by 2.5, were the ones that produced more dense biofilms. The expression of *ace* and *asa* genes was not different in planktonic and biofilm forms, and *esp* expression was greater in biofilm. Strain 25.1, which produced less

biofilm, had only one of the adhesion factors studied. *E. faecalis* was detected in 10% (3/30) and 43,4% (13/30) of the samples S1 using qPCR based on rDNA and rRNA respectively. At the samples S2 and S3, *E. faecalis* was found in 3,4% (1/30) of the samples by the method based on rDNA and in 20% (6/30) by the method based on rRNA. The detection of *E. faecalis* was greater by the method based on rRNA when compared to the rDNA at the initial samples (S1). Comparing the samples during the treatment, there were not significant reduction of the numbers of copies of the rDNA between S1 and S2 ($P = 0,10$), S2 and S3 ($P = 0,65$) and S1 and S3 ($P = 0,15$). In the same way, the levels of rRNA did not suffer significant changes in S2 ($P = 0,25$) when compared to the S1 samples, neither in S3 ($P = 0,46$) when compared to the S2 samples. Based on these data, it was concluded that there are variations in the presence of adhesion/coaggregation factors in strains of the same species, and these may be related to each other for greater virulence. Of the genes studied, *esp* seems to be related to denser biovolume of biofilm, since its expression increases under this condition. Also, the qPCR essay based on rRNA revealed a higher prevalence of *E. faecalis* at the primary endodontic infections and this bacteria remained metabolically active at the root canals after the biomechanical preparation and after intracanal medication.

Key words: endodontics, microbiology, anaerobiosis, virulence factors, real-time PCR, biofilm, confocal microscopy.

LISTA FIGURAS

- Figura 1** - Resultados de presença e ausência dos genes ace, asa e esp nas cepas coletadas de canais radiculares com infecção primária.....57
- Figura 2** - Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene ASA.57
- Figura 3** - Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene ACE.....58
- Figura 4** - Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene ESP.....58
- Figura 5** - Gráfico da viabilidade bacteriana das cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas, através do corante Life& Dead.60
- Figura 6** - (A) Gráfico do biovolume das cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas, através do corante Life& Dead. (B) Presença ou ausência dos genes estudados nas cepas de *Enterococcus faecalis*.60
- Figura 7** - Imagens obtidas através de microscópio confocal de varredura a laser, das diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares e cepa ATCC 29212.....61
- Figura 8** - Valores médios do número de cópias de rDNA e rRNA nas coletas realizadas durante o tratamento endodôntico64
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para confirmação de *Enterococcus faecalis*46
- Tabela 2** - Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para confirmação dos genes de virulência de *Enterococcus faecalis*46
- Tabela 3** - Taxa de detecção de *E. faecalis* por ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e DNA ribossômico (rDNA)63
- Tabela 4** - Valores médios e da mediana (mínima - máxima) do número de cópias de 16S rDNA e rRNA de *E. faecalis* em 30 canais radiculares antes (S1) e após (S2) o preparo químico cirúrgico e após a medicação intracanal (S3)64
-
-

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Biofilme e Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL).....	23
2.2	Análise molecular	24
2.3	Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos moleculares baseados em rDNA (gene 16S <i>rRNA</i>)	26
2.4	Prevalência do <i>Enterococcus faecalis</i>	27
2.5	Identificação de espécies microbianas no canal radicular por metodologias moleculares	28
2.6	Genes de adesão asa, ace e esp	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODO	41
4.1	Expressão gênica de fatores de virulência de <i>E. faecalis</i> isolados de canais radiculares com infecção primária, cultivados na forma planctônica ou em biofilme (EXPERIMENTO 1)	41
4.1.1	Isolamento das cepas	41
4.1.2	Biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i> e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).....	43
4.1.3	Expressão gênica dos fatores de adesão	44
4.2	Avaliação da quantidade e atividade metabólica de <i>Enterococcus faecalis</i> em infecções endodônticas primárias, antes e após o tratamento endodôntico, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA (EXPERIMENTO 2)	49

4.2.1	Procedimentos e coletas clínicas.....	49
4.2.2	Análise quantitativa e da atividade metabólica de <i>E. faecalis</i>	53
5	RESULTADOS	57
5.1	Expressão gênica de fatores de virulência de <i>E. faecalis</i> . Identificação dos genes de adesão com PCR Convencional nas diferentes cepas	57
5.2	Avaliação por Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) de biofilmes das diferentes cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados das infecções endodônticas primárias.....	59
5.3	Expressão gênica de fatores de virulência de <i>E. faecalis</i> . Expressão gênica por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	62
5.4	Taxa de detecção de <i>Enterococcus faecalis</i> pelos métodos rRNA e rDNA.....	62
5.5	Quantificação e metabolismo de <i>E. faecalis</i> antes e após os procedimentos endodônticos	63
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICES	93
	ANEXO	105

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada é reduzir o máximo possível os micro-organismos do sistema de canais radiculares, tendo em vista que estes são os agentes etiológicos da periodontite apical (KAKEHASHI *et al.* 1965). As bactérias estão presentes na forma de biofilme aderido às paredes dos canais radiculares e no interior dos túbulos dentinários (RICUCCI *et al.* 2010). Portanto, para promover a redução 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 (SIQUEIRA *et al.* 2009).

Uma espécie frequentemente encontrada em isolados de canais radiculares, inclusive em casos com doenças periapicais persistentes, é *Enterococcus faecalis* (RÔÇAS *et al.* 2004), um micro-organismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, capaz de se adaptar em alterações ambientais agressivas e de se aderir em superfície dentinária, túbulos dentinários e de manter-se viável durante longos períodos dentro do canal radicular (ARIAS-MOLIZ *et al.* 2009; BASMACI *et al.* 2013; CHIVATXARANUKUL *et al.* 2008; LOVE, 2001; SUNDQVIST *et al.* 1998).

Uma das principais características de *E. faecalis* é a capacidade de formar biofilme (AFKAMI *et al.* 2015; WILSON *et al.* 2015), estruturas organizadas envoltas por uma matriz polimérica extracelular que contribui para a resistência a diversas soluções químicas irrigantes e medicamentos (BASMACI *et al.* 2013; DASILVA *et al.* 2013; HALL-STOODLEY *et al.* 2004; WILSON *et al.* 2015). A habilidade de formar biofilme, assim como a virulência, são fatores significantes que contribuem para a persistência do *E. faecalis* após o tratamento endodôntico (DONLAN *et al.* 2002; WAAR *et al.* 2015; LAPPIN-SCOTT 2001).

Alguns estudos já mostraram que *E. faecalis* possuem potenciais fatores de virulência (REYNAUD AF GEIJERSSTAM *et al.* 2007; SEDGLEY C *et al.* 2005) como, substâncias de agregação (asa), adesinas de superfície (esp), gelatinase

(gelE), antígeno da endocardite (efaA) e antígeno do colágeno (ace) entre outros (REYNAUD AF GEIJERSSTAM *et al.* 2007; SEDGLEY C *et al.* 2005) que colaboram com a formação dos biofilmes. Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016) detectaram em *E. faecalis* isolados de canais radiculares que o gene *ace* estava presente em 100% das cepas, o gene *asa* em 60% e o *esp* em 70%. Estes resultados corroboram o estudo de Sedgley *et al.* (2005) que detectaram os fatores *asa*, *ace*, *efaA* e *gelE* em 100% das amostras e o gene *esp* em 61%. Adesinas de superfície como do gene *ace* (adesina do colágeno do enterococo) pode facilitar a adesão do *E. faecalis* à dentina (HUBBLE *et al.* 2003).

A pesquisa do aspecto estrutural desta bactéria em forma de biofilme por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e seu biovolume, pode ser correlacionado com a expressão dos seus fatores de adesão. Assim, a pesquisa da presença destes fatores de virulência no genótipo desta espécie, frequentemente isolada dos canais radiculares, pode esclarecer como esta bactéria desenvolve seus biofilmes e sua resistência e, se a interferência de procedimentos clínicos nestes fatores pode contribuir com melhorias no prognóstico dos tratamentos.

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 filos bacterianos reconhecidos nas infecções endodônticas devido a sua maior especificidade, sensibilidade e acurácia na identificação microbiana. Além disso, esses métodos permitem a detecção de espécies microbianas não cultiváveis, que correspondem a mais de 50% da microbiota dos canais radiculares (SIQUEIRA *et al.* 2009)

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 genes codificam moléculas de RNA ribossômico (rRNA). Considerando que cada bactéria possui poucas cópias do gene 16S *rRNA*, os dados da sequência desse gene podem ser usados tanto para

identificação quanto para quantificação bacteriana (SIQUEIRA *et al.* 2005). Entretanto, vale ressaltar, que os estudos moleculares baseados em rDNA também apresentam uma limitação, que é a não distinção entre as células vivas e mortas. Esse fato pode comprometer a avaliação dos procedimentos de desinfecção, levando a uma superestimação da quantidade de bactérias persistentes após o tratamento (SIQUEIRA *et al.* 2005).

Para solucionar esse problema, métodos moleculares baseados na detecção do próprio RNA ribossômico (rRNA) têm sido indicados para o estudo das infecções endodônticas, por ser este um indicador de atividade metabólica dos micro-organismos. Porém, esses métodos não possibilitam a quantificação absoluta das bactérias, pois os níveis de rRNA variam fortemente dependendo do estado fisiológico da célula. Devido às limitações de cada método, estudos recentes têm proposto uma associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA (genes rRNA) para uma avaliação simultânea da viabilidade e abundância das bactérias em uma comunidade bacteriana (ORSTAVIK *et al.* 1990; PINHEIRO *et al.* 2015; RYU *et al.* 2013). Além disso, a razão rRNA/rDNA poderá fornecer dados sobre atividade metabólica de diferentes bactérias, que pode variar de dormente a altamente metabólica. Até o presente momento, estudos moleculares investigando a atividade metabólica da microbiota persistente são escassos na literatura endodôntica (PINHEIRO *et al.* 2015). Portanto, o presente estudo visou aprofundar o conhecimento da microbiota que persiste após os procedimentos de desinfecção utilizando métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA.

O presente estudo investigou a presença e expressão gênica de três genes de adesão/agregação em cepas em forma planctônicas e em biofilme, em *Enterococcus faecalis* oriundos de infecções endodônticas primárias e também de uma cepa de referência. Assim, foi possível relacionar a presença dos genes com a formação dos biofilmes.

Além disso, *Enterococcus faecalis* oriundos de infecções endodônticas primárias e sua suscetibilidade ao tratamento endodôntico utilizando métodos baseados em rRNA e rDNA foram avaliados. Esses métodos permitiram o estudo de aspectos importantes na análise das bactérias persistentes nos canais radiculares

como prevalência, virulência, formação de biofilme, quantidade e atividade metabólica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilme e Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Na Endodontia, os biofilmes têm sido amplamente estudados para a avaliação da ação antimicrobiana de soluções irrigadoras (ÖZOK et al. 2007; CARPIO-PEROCHENA et al. 2011) e curativos de demora (ORDINOLA-ZAPATA et al. 2015). A simulação dos biofilmes *in vitro* contribui para um maior conhecimento de seu modo de ação e ajuda a encontrar soluções para sua eliminação.

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 permanecer 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. O modo protegido de crescimento dos biofilmes permite a sobrevivência em ambientes não favoráveis.

Para avaliar a formação desses Biofilmes, estudos utilizaram técnicas microscópicas, como a Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A microscopia confocal baseia-se na iluminação por varredura a laser, ponto-a-ponto, de um espécime biológico normalmente tratado ou marcado com compostos fluorescentes.

Andrade et al. (2015) desenvolveram uma metodologia de contaminação dentinária intratubular através de centrifugações e trocas consecutivas de meio de cultura de BHI (Brain Heart Infusion). Para avaliar a eficiência da técnica, foi realizado a análise em Microscopia Confocal de Varredura Laser com o uso do

corante Live/Dead, para verificar a viabilidade celular e formação do biofilme intratubular.

Zancan et al. (2016) avaliaram em seu estudo a ação antimicrobiana de algumas medicações intracanal em biofilme de 21 dias de *Enterococcus faecalis* e biofilme misto de *E. faecalis* com *P. aeruginosa*. Para essa análise, utilizaram a MCVL, com o corante Live/Dead para mensurar a porcentagem de células vivas.

Giardino et al. (2017) avaliaram a descontaminação da infecção intratubular, que foi induzida utilizando a técnica de contaminação preconizada por Andrade et al. (2015) através de irrigantes endodônticos e, avaliaram a viabilidade celular com a MCVL, com o corante Live/Dead.

Também Rodrigues et al. (2018) avaliaram a ação antimicrobiana dos irrigantes nanopartículas de prata com um veículo aquoso (AgNp), hipoclorito de sódio e clorexidina, contra biofilmes de *Enterococcus faecalis* e infecções de túbulos dentinários, utilizando a técnica de Andrade et al. (2015) para a contaminação intratubular e a MCVL, com o corante Live/Dead para avaliar a viabilidade celular

2.2 Análise molecular

De acordo com Siqueira & Roças (2005) a reação da cadeia em polimerase (PCR) convencional permite a identificação rápida de espécies microbianas cultiváveis ou incultiváveis com grande especificidade e sensibilidade. Porém, essa detecção mostra apenas a ausência ou a presença e não a quantidade do micro-organismo alvo. Outra limitação da PCR convencional, é que não é possível diferenciar se os micro-organismos estão viváveis ou não viáveis.

A reação PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma variante da PCR convencional, sendo uma ferramenta bastante sensível e confiável para a detecção e quantificação de ácidos nucleicos (Heid et al. 1996). É caracterizada pela medição contínua de produtos de amplificação ao longo da reação por meio de um sinal fluorescente, que a cada ciclo de amplificação permite que os produtos possam ser detectados e medidos em tempo real (Belgrader et al. 1999).

Com essa reação, pode-se avaliar a expressão gênica de determinados fatores de virulência das espécies, através da purificação de RNA e posterior transcrição para DNA complementar (cDNA), possibilitando a amplificação do fragmento alvo. Assim, é possível avaliar se aquela cepa bacteriana não apenas possui um gene para um fator de virulência específico, mas também se o está expressando ao se multiplicar, através da informação transmitida via RNA mensageiro.

Dessa forma, é pertinente o estudo e a padronização dos experimentos para realização da qPCR, buscando não só identificar as espécies, mas também avaliar seus fatores de virulência.

Beomidehagh *et al* (2018) avaliaram a relação da expressão do gene *efaA* com a formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* coletados de 170 dentes com infecção endodôntica, antes e depois de receber a aplicação de estímulos ácidos e alcalinos. Depois da formação do biofilme, realizaram o PCR Real-time (qPCR) para avaliar a expressão do gene *efaA*, em grupos com estímulo de ácido, estímulo alcalino e sem estímulo. 88% das amostras deram resultado positivo para a presença do gene *efaA*. Para a formação de biofilme, 49% formaram biofilmes maduros, 42% moderados e 10 % não formou biofilme. 59% apresentou maior expressão, quando observadas as cepas formadoras de biofilme, em forma isolada.

Nas últimas duas décadas, métodos moleculares independentes de cultura baseados em DNA e RNA bacteriano foram usados para estudo da microbiota que persiste aos procedimentos endodônticos de desinfecção. Neste tópico, serão revisados estudos clínicos com análise molecular independentes de cultura que avaliaram a microbiota dos canais radiculares antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção. Nos estudos utilizando métodos independentes de cultura, a análise da microbiota foi realizada por métodos moleculares qualitativos (PCR - reação de polimerase em cadeia), semi-quantitativos (hibridização DNA-DNA) ou quantitativos (qPCR - reação de polimerase em cadeia quantitativa). A análise da diversidade microbiana também foi realizada por sequenciamento genético em alguns estudos moleculares.

2.3 Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos moleculares baseados em rDNA (gene 16S *rRNA*)

Vianna et al. (2006) avaliaram *in vivo*, o grau da redução bacteriana após preparo químico-mecânico de dentes humanos com necrose pulpar utilizando hipoclorito de sódio e clorexidina. A avaliação da redução bacteriana foi realizada por PCR quantitativo em tempo real e também por cultura microbiana. A carga bacteriana foi reduzida em ambos os grupos. Quando se utilizou a quantificação por qPCR, a redução bacteriana foi superior quando comparada com a técnica da cultura

Pinheiro et al. (2015) investigaram a sensibilidade da reação de qPCR baseado em rRNA (RT-qPCR), comparado ao método baseado em rDNA, para identificação de *E. faecalis* de amostras clínicas de 18 dentes com necessidade de retratamento endodôntico. *E. faecalis* foi detectado em 77,8% e 72,2% das amostras iniciais utilizando qPCR baseado em *rRNA* e *rDNA*, respectivamente. Em contraste, após o preparo químico-cirúrgico, *E. faecalis* foi detectado em apenas 33,3% das amostras usando rDNA e em 61,1% das amostras analisadas pelo método baseado em rRNA. O número de cópias de rRNA de *E. faecalis* foi maior que o número de cópias de rDNA nas amostras antes e após o preparo químico-cirúrgico, indicando uma grande sensibilidade no método baseado em rRNA. Nas amostras positivas para rRNA e rDNA, foi calculada a razão rRNA/rDNA para análise do metabolismo bacteriano. Essa análise revelou que o número de cópias de rRNA era mais elevado do que o número de cópias rDNA, indicando que *E. faecalis* permanecia metabolicamente ativo nas infecções persistentes após o preparo químico-cirúrgico. Esses resultados demonstraram que qPCR baseado em rRNA foi mais sensível que o método baseado em rDNA para detecção de *E. faecalis* em amostras de canais radiculares. Este estudo também mostrou que o *E. faecalis* pode permanecer metabolicamente ativo após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

2.4 Prevalência do *Enterococcus faecalis*

Há uma controvérsia entre os estudos quanto a prevalência de *E. faecalis* em infecções primárias. Essas diferenças entre os estudos podem ser devidas, a diversos fatores, incluindo: método microbiológico de estudo, número de amostras, técnicas utilizadas durante o tratamento, além da localização geográfica. Portanto são necessários novos estudos utilizando diferentes métodos moleculares, especialmente métodos baseados em rRna.

Ayre et al. 2018, desenvolveram um estudo que investigou a resposta do hospedeiro a infecção pulpar polimicrobiana composta de *Streptococcus anginosus* e *Enterococcus faecalis*, usando um método *ex vivo* em dente de rato. Foram inoculadas, fatias de dente, com culturas planctônicas de *S. anginosus* ou *E. faecalis*, e biofilme das duas cepas juntas, numa proporção de 50:50 e 90:10. A aderência foi semi quantificada medindo a área coberta por fluorescência de bactérias específicas. A resposta do hospedeiro foi estabelecida por contagem de células histológicas viáveis, e a resposta inflamatória foi medida usando transcrição reversa quantitativa PCR (RT-qPCR) e imuno-histoquímica. Foi observada uma redução significativa na viabilidade celular na infecção com a cepas planctônicas e polimicrobianas, sem diferença significativa entre elas. Infecções com *E. faecalis* apresentaram maior aumento do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e expressão de interleucina 1 β (IL-1 β). comparado com amostras não infectadas. As células de *E. faecalis* que foram mortas pelo tratamento de calor apresentaram incapacidade de induzir a mesma resposta inflamatória, sugerindo que a patogenicidade do *E. faecalis* nas pulpites está relacionado a habilidade de se aderir aos tecidos vasculares.

Zhang et al. (2015) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de comparar a prevalência de *E. faecalis* em infecções primárias e persistentes. Apesar dos estudos já realizados sobre a comparação entre infecção intrarradicular persistente comparado com infecção intrarradicular primária, ainda há controvérsias. Foi realizado uma busca na literatura com específicos critérios de inclusão para coletar os estudos comparativos de prevalência de *E. faecalis* em canais radiculares com infecções primárias e persistentes. Foi aplicada uma estatística descritiva por causa da alta heterogeneidade entre os estudos. Análise dos subgrupos de acordo

com os diferentes métodos de detecção (cultura e reação de cadeia de polimerase) e análise sensitiva foi aplicada. A meta-análise foi conduzida com a ajuda de um programa de análise Stata/SE 12.0 (StataCorp, College Station, TX) depois de excluir os estudos com formas incertas de lesões pulpares e perirradiculares nos grupos de infecção primária. A revisão sistemática incluiu 10 estudos, com o total de 972 dentes. Entre eles, 2 estudos usaram técnica de cultura, 6 estudos usaram PCR, e outros 2 usaram as duas técnicas. A detecção de *E. faecalis* em ambos os métodos foram altas quando avaliaram infecções persistentes quando comparada a periodontite periapical crônica em dentes com infecção primária e não tratados. A diferença estatística foi significativa (risco relativo = 7,247). Concluíram que a correlação de *E. faecalis* é mais alta em infecções persistentes em relação a periodontite periapical crônica de dentes sem tratamento endodôntico.

2.5 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 & 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 (2003) 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 *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae*.

Figdor et al. (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 & 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 & 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 et al. (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-periodontais 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 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 filos 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 foram analisados 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 freqüentemente 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 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.

2.6 Genes de adesão asa, ace e esp

Estes genes são de adesão/coagregação pertencentes a espécie bacteriana *Enterococcus faecalis*. A maioria dos estudos de isolados clínicos desta espécie, são de infecções endodônticas secundárias, e a informação sobre os fatores de virulências são limitados para as infecções primárias, portanto, essa tese tem por objetivo avaliar a expressão de genes de virulência em infecção primária, baseada em estudos anteriores de lesões secundárias.

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, endocardite bacteriana e trato urinário. Foram avaliados estudos de Ilha de patogenicidade (PAI) 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. O gene esp também foi associado à formação de biofilme e colonização do trato urinário. Mostraram ainda 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. (2002) 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 o gene *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

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas primárias e expressão de fatores de virulência, além da sua suscetibilidade aos procedimentos endodônticos.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a prevalência e os fatores de virulência de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares com infecção primária, cultivados na forma planctônica ou em biofilme.
 - Avaliar a quantidade e atividade metabólica de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias, antes e após os procedimentos endodônticos, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Expressão gênica de fatores de virulência de *E. faecalis* isolados de canais radiculares com infecção primária, cultivados na forma planctônica ou em biofilme (EXPERIMENTO 1).

Foram investigadas 5 cepas bacterianas da espécie *Enterococcus faecalis* isoladas de 22 canais radiculares de pacientes com infecção primária, para verificar a expressão gênica de seus fatores de adesão. Esta espécie foi encontrada em 5 casos de 22 avaliados, totalizando 23% de prevalência (5/22). Também a cepa padrão ATCC (American Type Culture Collection) 29212 da mesma espécie foi inserida neste estudo, por ser a cepa de referência. Assim, as 6 cepas obtidas foram cultivadas na forma planctônica ou organizadas em biofilmes, para proceder à avaliação proposta.

4.1.1 Isolamento das cepas

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)**. Foram realizadas tantas coletas quanto necessárias para o isolamento das cepas.

Os critérios de inclusão/ exclusão de pacientes foram baseados em estudo prévio (Nakamura et al., 2018). Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de necrose pulpar (confirmado pela resposta negativa ao teste de sensibilidade ao frio com gás refrigerante) e periodontite apical assintomática. Os critérios de exclusão foram: pacientes que utilizaram antibióticos nos últimos 3 meses; dentes com perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto; dentes com câmara pulpar aberta/ exposta ao meio bucal; dentes com bolsa

periodontal superior a 4 mm; dentes com evidência radiográfica de tratamento endodôntico prévio, ápice aberto, fratura, reabsorção ou calcificação.

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 NaOCl (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 diamantadas esféricas em 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 o mais breve possível 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 H₂, 10% de CO₂ e 80% de N₂ 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 RCM (Reinforced Clostridial Medium, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) pré-reduzido. Das diluições 10⁻² e 10⁻⁴ 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 48h para permitir o desenvolvimento destes micro-organismos.

4.1.2 Biofilmes de *Enterococcus faecalis* e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Foram obtidos biofilmes das cepas de *Enterococcus faecalis*, adaptados do protocolo utilizado por Rodrigues et al. (2018) e Oda et al. (2019). Foram obtidos blocos de dentina a partir de Incisivos centrais bovinos com raízes totalmente desenvolvidas. A dentina radicular foi cortada com brocas trefina de 4,0 mm de diâmetro sob irrigação. Os blocos de dentina foram tratados com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP) por 15 minutos e 17% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Biodinâmica, Ibiporã, PR) por 3 minutos e esterilizados em um tubo contendo água destilada em autoclave a 121°C por 20 minutos. As superfícies das amostras foram marcadas assepticamente com um lápis e, em seguida, os espécimes foram colocados em placas de cultura de 24 poços. A superfície marcada foi colocada voltada para a superfície da placa, e o outro lado foi usado para o desenvolvimento do biofilme. A formação de biofilme foi obtida utilizando inóculo das cepas isoladas de *Enterococcus faecalis* e da cepa ATCC, de 3×10^8 UFC/mL, concentração esta verificada em espectrofotômetro. Os blocos de dentina foram mantidos submersos em 1,8 mL de caldo BHI esterilizado e 0,2 mL de inóculo, em cada poço da placa. As placas de cultura foram colocadas em estufa bacteriológica a 37°C por 7 dias. O caldo BHI foi renovado a cada 24 horas sem adição de novo inóculo para garantir que os microrganismos tivessem disponibilidade suficiente de nutrientes. Após o período de incubação, os espécimes cobertos com biofilme foram lavados duas vezes em solução salina para remover vestígios de meio de cultura e bactérias planctônicas não aderentes.

Os biofilmes foram corados com o kit LIVE/DEAD (kit BacLight Bacterial Viability L-7012, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Foram utilizados dois frascos para os corantes componentes – SYTO 9 e iodeto de propídio, misturados na proporção de 1:1, de acordo com as instruções do fabricante. Os comprimentos de onda de absorção e emissão foram 480 / 500 nm para o corante SYTO 9 e 490/635 nm para o iodeto de propídio (SHEN, STOJICIC, HAAPASALO, 2010). Os biofilmes foram mensurados quanto ao volume por microscopia confocal de varredura a laser, utilizando um microscópio confocal invertido Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha).

As imagens foram adquiridas utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence *software* (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha). A razão do volume das células fluorescentes verdes (células vivas) sobre as células fluorescentes verdes mais as vermelhas (células vivas e mortas) indicou a quantidade de células vivas no biofilme. Para a exibição das imagens com ambas as cores, foi utilizada a captura com dois canais simultâneos. Para a contagem celular foi utilizado o software bioImageL 2.0 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009). Este software permite a avaliação da estrutura e distribuição do biofilme caracterizadas pelas variáveis biovolume (biomassa em μm^3) e cobertura do substrato (a porcentagem do substrato que o microrganismo é capaz de colonizar).

4.1.3 Expressão gênica dos fatores de adesão

De acordo com a literatura, cada espécie possui um gene de adesão específico, que confere essa vantagem à bactéria. Estes genes específicos foram avaliados quanto à sua expressão através da técnica do Real-time PCR (qPCR), ou seja, a maior ou menor produção do fator de adesão, estando as bactérias produtoras na forma planctônica ou de biofilme, de ATCC ou isolado clínico. Os genes testados foram ace (fator de adesão), asa (agregação), esp (adesinas de superfície) de acordo com Sedgley et al. (2005).

Inicialmente, das colônias isoladas, foi realizada a cultura de 24h a 48h em caldo BHI a 37°C em câmara anaeróbia para estoque por congelamento e realização dos testes. A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Farmacologia da FOB-USP, para realização da identificação (confirmação) da espécie. Posteriormente, foi realizada a extração de RNA das cepas cultivadas em biofilmes ou forma planctônica para averiguação da expressão gênica das cepas.

As amostras das cepas 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 µL de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 2 µL de Proteinase K, e incubados por 15 minutos a 65°C. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e foram adicionados 150 µL 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 µL 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). Após esses processos, foram realizados novo tratamento com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e uma reação de PCR para confirmar a ausência de DNA nas amostras de RNA. Para isso, foram utilizados iniciadores universais para região do gene 16S *rRNA*. A quantificação dos ácidos nucleicos em cada amostra foi realizada no aparelho do NanoDrop e analisada pelo software ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). As alíquotas de DNA foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento do uso. Para as amostras de RNA, foi realizada a Reação de Transcriptase Reversa (RT) para sintetizar o cDNA (DNA complementar), utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenado em freezer -20 °C.

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

Na tabela 1, estão descritos os *primers* para as reações de PCR utilizadas para o micro-organismo *E. faecalis*, adaptadas de Sedgley et al. (2005).

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para confirmação de *Enterococcus faecalis*.

Espécies 16S rRNA	Pares de primers (5'-3')	Comprimento do fragmento amplificado em pares de base (pb)	Referência
<i>E. faecalis</i>	CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	138	Sedgley <i>et al.</i> 2005

Foi utilizado o termociclador do modelo StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para a amplificação do DNA, seguindo os protocolos de temperatura de Sedgley *et al.* (2005).

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). Uma vez confirmada a cepa como sendo da espécie *Enterococcus faecalis*, outras reações de PCR convencional foram realizadas para averiguar se as cepas possuíam os genes selecionados para este estudo de expressão gênica. Para averiguar a presença dos genes em cada uma das cepas, utilizou-se os *primers* descritos anteriormente por Shankar *et al.* (1999) e Creti *et al.* (2004) como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para confirmação dos genes de virulência de *Enterococcus faecalis*:

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

Após a confirmação por PCR, as amostras positivas para os genes foram utilizadas para o estudo dos fatores de virulência. Para tal, utilizado o cDNA, que foi transcrito de acordo com a metodologia descrita.

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*.

Os fatores de adesão e agregação de *Enterococcus faecalis* foram avaliados por Q-PCR, com triplicatas para cada cepa na forma planctônica e sextuplicata para cada cepa na forma de biofilme. Para cada gene testado, foram examinadas somente as cepas positivas nas reações de PCR convencional quanto à presença do mesmo.

Todas as reações foram realizadas com o gene 16S rRNA como controle endógeno, e foi calculado a quantificação relativa ao controle endógeno.

A expressão quantitativa dos genes pesquisados foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), em um aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Essa técnica realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software) por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos (genes de referência). O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes Power SYBR Green, como determinado pelo fabricante. A reação compreende 2 min a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. As condições de PCR para cada alvo foram cuidadosamente

observadas com atenção para a concentração de *primer*, ausência de formação de *primer-dimer*, e ainda com relação à eficiência de amplificação dos genes dos alvos. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. O limiar para positividade da PCR em tempo real foi determinado com base em controles negativos ou controle água. Os cálculos para a determinação do nível relativo de expressão gênica foram feitos conforme instrução oriunda do Boletim do Usuário (P/N 4303859) da Applied Biosystems. As médias dos valores de CT de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização a um controle endógeno (gene de referência), e então comparados com o controle alvo-endógeno em grupo de células controle não estimuladas para o cálculo do aumento da expressão, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, também de acordo com o Boletim do Usuário.

O grupo calibrador utilizado foi a cepa ATCC, uma vez que é a cepa de referência para os estudos microbiológicos. Foi possível avaliar se os genes de adesão da espécie estudada apresentaram maior ou menor expressão gênica nas bactérias isoladas dos canais e nas formas planctônicas ou de biofilme.

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando o método $\Delta\Delta Ct$. Os dados foram analisados utilizando $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = (CT_{\text{gene alvo}} - CT_{16S \text{ RNA}})$ da amostra clínica - $(CT_{\text{gene alvo}} - CT_{16S \text{ RNA}})$ da amostra ATCC 29212. A diferença de número de vezes (*fold changes*) foi realizada de acordo com os dados do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$ foi considerado aumento e $2^{-\Delta\Delta Ct} < 0.5$ foi considerado diminuição da expressão gênica (Wang et al. 2012).

A análise estatística foi realizada no Programa SPSS 15.0 for Windows (Statistical Package for Social Science, Reino Unido) utilizando testes comparativos de análise de variância, para a variável presença ou ausência de cada um dos genes dos fatores de virulência das cepas testadas. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($p < 0,05$) também foi utilizado para análise estatística do biovolume dos biofilmes das linhagens testadas.

4.2 Avaliação da quantidade e atividade metabólica de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias, antes e após o tratamento endodôntico, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA (EXPERIMENTO 2).

A metodologia utilizada neste trabalho baseou-se em estudos clínicos e microbiológicos prévios (Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018). Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa nº 2.201.768 desta instituição e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por cada paciente. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOUSP e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

4.2.1 Procedimentos e coletas clínicas

Os critérios de inclusão/ exclusão de pacientes foram baseados em estudo prévio (Nakamura et al., 2018). Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de necrose pulpar (confirmado pela resposta negativa ao teste de sensibilidade ao frio com gás refrigerante) e periodontite apical assintomática. Os critérios de exclusão foram: pacientes que utilizaram antibióticos nos últimos 3 meses; dentes com perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto; dentes com câmara pulpar aberta/ exposta ao meio bucal; dentes com bolsa periodontal superior a 4 mm; dentes com evidência radiográfica de tratamento endodôntico prévio, ápice aberto, fratura, reabsorção ou calcificação.

Além disso, dentes com uma curvatura maior que 20° (Schneider, 1971), e raízes mais curtas que 15 mm ou maiores que 25 mm foram excluídos. Também foram excluídos da pesquisa pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas, portadores de marca-passos ou próteses coronarianas. Após a aplicação dos critérios acima relatados, foram selecionados 22

pacientes com dentes com infecções endodônticas primárias para tratamento endodôntico e coletas microbiológicas.

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da FOUSP por 2 pós-graduandos do Programa de Endodontia, com experiência de mais de 5 anos na especialidade. As coletas microbiológicas foram realizadas de acordo com estudos prévios (Nakamura et al., 2018).

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes receberam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Então, os dentes foram anestesiados e realizados os isolamentos absolutos com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), grampos metálicos adequados (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e barreira gengival (Top Dam, FGM, Brasil). A antisepsia do campo operatório e da coroa dentária foram realizadas com *swabs* esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, EUA) embebidos em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl, Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil), por mais 30s, sendo este neutralizado por tiosulfato de sódio 5% (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) (RÔÇAS et al., 2004).

A abertura coronária foi realizada em duas etapas, com auxílio de pontas diamantadas esféricas (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação refrigerados com auxílio de seringas de 20mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizados (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, o protocolo de antisepsia da coroa dental e o campo operatório foi novamente realizado, como já foi descrito anteriormente; e a abertura coronária finalizada com novas pontas esterilizadas, refrigeradas com soro fisiológico. Coleta da coroa (ângulo cavo-superficial da cavidade de acesso) foi realizada com papel absorvente para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção. A ausência de bactérias na coleta da coroa dentária foi comprovada por meio de PCR convencional, utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria*.

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar foi aspirada e o canal radicular preenchido com solução salina. A odontometria foi realizada com um Instrumento tipo K número 10 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça) com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O comprimento real de trabalho (CRT) foi determinado em 0,5 mm aquém do limite zero observado no localizador foraminal. Um instrumento tipo H número 15 foi pressionado contra as paredes do canal para criar raspas de dentina e suspender bactérias na solução. Cinco cones de papel número 15 esterilizados foram introduzidos individualmente no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias (**S1**), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. A parte ativa da lima utilizada e os demais cones foram depositados em microtubos de 1,5 mL esterilizados contendo 300 µL de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estado Unidos da América).

No passo seguinte, a câmara pulpar foi preenchida com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, que foi agitada e carregada progressivamente no sentido coroa-ápice com o auxílio de instrumentos tipo K até atingir o CRT.

Após o esvaziamento inicial do canal, instrumentos manuais do tipo K foram levados sem pressão até comprimento real de trabalho, em ordem crescente de diâmetro, do instrumento número 10 ao número 40 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça). O primeiro instrumento que demonstrasse travamento no CRT foi utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado no preparo químico-cirúrgico. Se o travamento fosse compatível com instrumentos 10 ou 15, o dente foi excluído da pesquisa, pela dificuldade da realização da coleta inicial. Se o travamento fosse compatível com as limas 20, 25 ou 30, o instrumento Reciproc R40 foi escolhido; e quando o instrumento inicial de referência fosse o 35 ou 40, o preparo foi realizado com o instrumento Reciproc R50.

Os instrumentos reciprocantes foram acionados por motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) ajustado à cinemática preconizada para cada instrumento, sempre na presença de NaOCl 2,5%. O instrumento Reciproc selecionado foi levado ao interior do conduto em movimento reciprocante, seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de maneira a avançar em direção apical a cada ciclo. Ao término de cada sequência, o instrumento foi limpo

com gaze esterilizada e o canal irrigado com NaOCl 2,5%, atingindo-se o CRT apenas no último ciclo de penetração.

Durante o preparo, foram utilizados 40 mL de solução irrigadora por canal, sendo 30 mL durante a instrumentação e mais 10 mL ao final do preparo, com as pontas irrigadoras posicionadas a aproximadamente 2 mm aquém do comprimento real de trabalho, utilizadas em movimentos de vai e vem com pequena amplitude. A irrigação durante o preparo químico-cirúrgico foi realizada com seringas plásticas esterilizadas e apirogênicas de 10 mL e pontas endodônticas de irrigação Endo-EZE (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) com diâmetro de 30G e saída lateral meia canal, ao passo que a aspiração da substância irrigadora foi realizada através de cânulas de aspiração SurgiTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) acopladas à bomba a vácuo odontológica. Ao final, o canal foi aspirado com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014' e 0,019'' (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e novamente irrigada com 5ml de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto. O canal foi novamente aspirado, seco com cones de papel absorvente, e preenchido com soro fisiológico apirogênico. Assim, realizando uma nova coleta microbiológica (**S2**), como descrito anteriormente.

Após a coleta, foi realizada uma irrigação final com NaOCl 2,5% e EDTA-T 17% com um protocolo semelhante ao descrito por Nakamura et al. (2018). Os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente, e então, preenchidos com a pasta de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) Ultracal XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). Esta pasta apresenta um veículo aquoso à base de metil-celulose e vem acondicionada em uma seringa plástica acoplada a uma agulha NaviTip (0,33 mm de diâmetro). A agulha foi inserida no comprimento real de trabalho para proporcionar o preenchimento do canal radicular em toda sua extensão. Após o preenchimento, essa pasta foi compactada com bolinhas de algodão esterilizadas com auxílio de pinças clínicas e calcadores de Paiva. O completo preenchimento do canal radicular foi verificado através de radiografia periapical. Por fim, as cavidades de acesso foram seladas com uma camada de 2 mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro Riva Self Cure (SDI Limited, Victoria, Austrália).

Os pacientes retornaram à clínica da faculdade para uma segunda sessão de tratamento após um período de 14 dias, e os procedimentos de anestesia, isolamento absoluto, abertura coronária e desinfecção do campo operatório foram realizados seguindo o mesmo protocolo utilizado na primeira sessão clínica. Após a remoção do selamento provisório e nova coleta para verificação da desinfecção do campo, a medicação intracanal foi removida do interior dos canais radiculares utilizando-se 10 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17% por canal e leve agitação com limas manuais tipo K número 15. E então, uma terceira coleta (**S3**) foi realizada em ambos os grupos seguindo os mesmos critérios de procedimentos realizados nas coletas anteriores.

Em seguida, os canais foram irrigados com 10 mL de NaOCl 2,5% e re-instrumentados com o mesmo instrumento utilizado na primeira sessão de tratamento. Então, um novo procedimento de irrigação final com 10 mL de NaOCl (2,5%), 10 ml de EDTA (17%), com seringa e pontas de irrigação.

Após a secagem dos condutos por meio de aspiração e utilização de cones de papel absorvente, os canais foram obturados por meio da técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH Plus (Dentsply Maillefer), e os acessos coronários devidamente selados com restaurações de resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA).

Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento da análise microbiológica.

4.2.2 Análise quantitativa e da atividade metabólica de *E. faecalis*

Foi realizado o mesmo protocolo de purificação de DNA, RNA e síntese de cDNA citado acima, para expressão gênica.

Os níveis de DNA e cDNA de *E. faecalis* nas amostras foram avaliados por qPCR, utilizando iniciadores específicos para o gene 16S *rRNA*: 5'- GGG TTG TAA ACC GCT TTC- GCTG-3' e 3'- GGC ACA CCC ATC TCT GAG- CAC -5' (Rôças et al., 2010). As reações foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA), 100 nM de cada *primer*, 2 µL da amostra (DNA ou cDNA) e H₂O. Nos controles negativos foram utilizados 2 µL de H₂O como molde. As reações de qPCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral do ICB-USP, utilizando o **StepOne Plus Real-Time PCR System** (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O ciclo de amplificação foi: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 95°C por 15s. A curva padrão foi construída utilizando plasmídeos recombinantes contendo fragmentos de 1.500 pb do gene 16S *rRNA* de *E. faecalis*. Todas as amostras foram corridas em triplicata, utilizando o valor médio para análise do número de cópias de rRNA e rDNA por amostra de canal radicular. Para avaliar a atividade metabólica foi utilizado o coeficiente de correlação (r^2), eficiência de amplificação (E) e valores de y da curva padrão para qPCR utilizando iniciadores específicos para *E. faecalis*, que foram 0,995; 104,387% e 35,415, respectivamente.

Os dados foram analisados por testes estatísticos e o nível de significância de todos os testes foi 5%. A análise quantitativa dos níveis de rDNA e rRNA bacteriano entre as amostras S1, S2 e S3 foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. A comparação da taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA foi realizada utilizando teste de McNemar. As bactérias foram consideradas metabolicamente ativas se a razão rRNA/rDNA se apresentasse maior ou igual 1 (Campbell et al., 2011). O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar as diferenças nas razões rRNA/rDNA das bactérias entre as amostras.

O número de casos verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos pelo método baseado em rDNA foi calculado em comparação ao método baseado em rRNA, o qual foi considerado um indicador de viabilidade bacteriana (padrão ouro). Baseado nesses dados, foram calculadas as taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia do método baseado em rDNA para detectar células viáveis de *E. faecalis*.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Expressão gênica de fatores de virulência de *E. faecalis*. Identificação dos genes de adesão com PCR Convencional nas diferentes cepas.

Foi realizada a reação de PCR convencional para averiguação da presença dos genes propostos para o estudo, no DNA das cepas estudadas, observando-se que nem sempre os genes estavam presentes, como visto nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Genes	ATCC	2.5	25.1	37	P1	P2
ace	+	+	+	+	+	+
asa	+	-	-	-	+	+
esp	-	+	-	+	+	+

Figura 1 – Resultados de presença e ausência dos genes ace, asa e esp nas cepas coletadas de canais radiculares com infecção primária.

Figura 2 – Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene ASA.

Gene ACE

Figura 3 – Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene ACE.

Gene ESP

Figura 4 – Imagem de gel de eletroforese evidenciando a presença ou ausência de banda referente à amplificação de fragmento referente ao gene ESP.

5.2 Avaliação por Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) de biofilmes das diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* isolados das infecções endodônticas primárias

De um modo geral, os biofilmes de todas as cepas mostraram boa viabilidade neste protocolo de confecção aqui adotado, observada através do corante Live & Dead, que cora as bactérias viáveis em verde e as mortas em vermelho. A cepa 2.5 (isolado clínico) demonstrou maior viabilidade bacteriana, estatisticamente significativa, em relação às cepas 25.1, 37 e P2 (Figura 5).

As cepas apresentaram os seguintes valores de viabilidade em porcentagem, de acordo com a mediana e os valores mínimo e máximo entre parêntesis: Cepa ATCC, 95,49 (6,692-99,20), Cepa 2.5, 97,90 (42,76-99,66), cepa 25.1, 84,76 (0,01-99,29), cepa 37, 85,37 (3,16-99,21), cepa P1, 94,24 (15,58-98,56) e cepa P2, 85,83 (16,02-99,19).

Quanto ao biovolume (Figura 6A), a cepa 25.1 foi a que produziu menor biofilme, sendo diferente estatisticamente das cepas 2.5, 37, P1 e P2. A cepa 37 seguida da 2.5 foram as que produziram maiores biofilmes.

Na figura 7 estão apresentadas imagens de biofilmes representativos das cepas, com bactérias coradas em verde significando sua viabilidade e onde se observam diferentes volumes das diferentes cepas.

Figura 5 – Gráfico da viabilidade bacteriana das cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas, através do corante Live& Dead.

Figura 6 – (A) Gráfico do biovolume das cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas, através do corante Live& Dead. (B) Presença ou ausência dos genes estudados nas cepas de *Enterococcus faecalis*.

Nos testes moleculares, foi realizada a reação de PCR convencional para averiguação da presença dos genes propostos para o estudo no DNA das cepas coletadas (Figura 1, Figura 6B). Para cada gene testado, foram avaliadas a expressão gênica (em PCR em tempo real - qPCR) somente das cepas positivas nas reações de PCR convencional quanto à presença do mesmo.

A Figura 6 estabelece uma relação entre a presença dos genes (6B) e os volumes dos biofilmes (6A). Observa-se que a cepa 25.1 não apresenta em seu código genético os genes *asa* e *esp*, e foi a que produziu biofilmes com menores volumes.

Figura 7 - Imagens obtidas através de microscópio confocal de varredura a laser, das diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares e cepa ATCC 29212.

5.3 Expressão gênica de fatores de virulência de *E. faecalis*. Expressão gênica por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Comparada com a expressão de *asa* da cepa ATCC 29212, os isolados clínicos mostraram uma diminuição da expressão gênica nas formas planctônicas (média de 0,06 vezes, desvio padrão 0,01; $p < 0,0001$) ou em biofilmes (média de 0,05 vezes; desvio padrão 0,04; $p < 0,0001$). Quanto à expressão relativa do gene *ace*, não houve diferença entre a cepa ATCC 29212 e os isolados clínicos nas formas planctônicas ou em biofilmes (ambos com uma média de 0,5 vezes; $p > 0,05$).

Como a cepa ATCC 29212 não tem no seu genoma o gene *esp*, os isolados clínicos nas suas formas planctônicas serviram como controle dos seus respectivos biofilmes. Utilizando esses parâmetros, houve um aumento na expressão relativa do gene *esp* nos isolados na forma de biofilme (média de 2,63 vezes; desvio padrão 0,3; $p = 0,04$).

5.4 Taxa de detecção de *Enterococcus faecalis* pelos métodos rRNA e rDNA

Para analisar a taxa de detecção de *E. faecalis* antes e após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA foi utilizado o teste de McNemar considerando $P < 0,05$. Com isso, *E. faecalis* foi detectado em 10% (3/30) e 43,4% (13/30) das amostras S1 utilizando qPCR baseado em rDNA e rRNA, respectivamente. Nas amostras S2 e S3, *E. faecalis* foi detectado em 3,4% (1/30) das amostras utilizando o método baseado em rDNA e em 20% (6/30) pelo método baseado em rRNA. A taxa de detecção de *E. faecalis* foi maior pelo método baseado em rRNA quando comparado ao método baseado em rDNA nas amostras iniciais (S1) dos canais radiculares de infecções primárias ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxa de detecção de *E. faecalis* por ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e DNA ribossômico (rDNA)

<i>E.faecalis</i>		S1		S2		S3				
		rDNA		P	rDNA		P	rDNA		P
		+	-		+	-		+	-	
rRNA	+	3	10		1	5		1	5	
	-	0	17	0,002	0	24	0,06	0	24	0,06

Tabela 4 - Valores médios e da mediana (mínima - máxima) do número de cópias de 16S rDNA e rRNA de *E. faecalis* em 30 canais radiculares antes (S1) e após (S2) o preparo químico cirúrgico e após a medicação intracanal (S3)

Amostras		Grupos		Valor de <i>P</i>
		r DNA	rRNA	
S1	Mediana	0,00	0,00	0,17
	(Intervalo)	(0,00 – 2,69 x 10 ⁵)	(0,00 – 2,11 x 10 ⁵)	
	Média	1,35 x 10 ⁴	2,15 x 10 ⁴	
	(Desvio Padrão)	(5,34 x 10 ⁴)	(5,49 x 10 ⁴)	
S2	Mediana	0,00	0,00	0,02
	(Intervalo)	(0,00 – 5,43 x 10 ³)	(0,00 – 7,76 x 10 ⁴)	
	Média	2,81 x 10 ²	4,65 x 10 ³	
	(Desvio Padrão)	(9,91 x 10 ²)	(1,51 x 10 ⁴)	
S3	Mediana	0,00	0,00	0,02
	(Intervalo)	(0,00 – 7,70 x 10 ³)	(0,00 – 5,67 x 10 ⁴)	
	Média	2,57 x 10 ²	5,85 x 10 ⁴	
	(Desvio Padrão)	(1,41 x 10 ³)	(1,49x 10 ⁴)	

Fonte: a autora.

Figura 8 - Valores médios do número de cópias de rDNA e rRNA nas coletas realizadas durante o tratamento endodôntico

Nas amostras positivas para os dois métodos, foi calculada a razão rRNA/rDNA. Em 3 amostras S1 positivas, os valores da razão rRNA/rDNA foram menores que 1 (valor médio de 0,24), indicando um baixo metabolismo de *E. faecalis* nas infecções primárias. Em S2 e S3 apenas 1 amostra apresentou reações de qPCR positivas para rDNA, e a razão rRNA/rDNA dessas amostras foi igual a 2, indicando que *E. faecalis* persistiu ativo após os procedimentos endodônticos.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

E. faecalis é comumente encontrado em canais radiculares infectados, principalmente em casos de periodontite apical persistente após o tratamento (ROÇAS *et al.* 2004; GOMES *et al.* 2008; RICUCCI *et al.* 2010; PINHEIRO *et al.* 2015). Embora *E. faecalis* seja mais prevalente em infecções endodônticas persistentes/ secundárias (ROÇAS *et al.* 2004; PINHEIRO *et al.* 2015), há evidências de que essa espécie bacteriana também possa estar associada a infecções endodônticas primárias (GOMES *et al.* 2006; LINS *et al.* 2013). No presente estudo, a prevalência de *E. faecalis* pelo método da cultura foi baixa (12,5%), o que está de acordo com achados prévios (GOMES *et al.* 2006). Em casos de infecções endodônticas primárias, Gomes *et al.* (2006) detectaram *E. faecalis* em 4% e 82% dos casos pelos métodos de cultura e PCR, respectivamente. Esses dados sugerem que *E. faecalis* pode estar presente em infecções endodônticas primárias em níveis abaixo do limite de detecção do método da cultura. Uma vez presente, essa bactéria pode resistir aos procedimentos endodônticos de desinfecção e persistir nos canais radiculares após o tratamento. Alguns fatores podem contribuir para sobrevivência de *E. faecalis* nos canais radiculares, incluindo sua capacidade de sobreviver em ambientes com baixa nutrição e tolerar altos níveis alcalinos promovidos pela medicação intracanal com hidróxido de cálcio (PORTENIER *et al.* 2003; CWIKLA *et al.* 2003). Outra característica importante para resistência bacteriana nos canais radiculares é a capacidade de adesão e formação de biofilme nas paredes dentinárias (LOVE 2001; CHIVATXARANUKUL *et al.* 2008; ARIAS-MOLIZ *et al.* 2009; BASMACI *et al.* 2013). Biofilmes de *E. faecalis* foram observados em paredes dentinárias dos canais radiculares, o que pode permitir a bactéria resistir ao efeito bactericida de substâncias antimicrobianas e contribuir para o insucesso endodôntico (DISTEL *et al.* 2002).

Quanto ao papel de *E. faecalis* nas infecções endodônticas, acredita-se que o conhecimento dos fatores de virulência dessa bactéria seja fundamental para a compreensão do seu possível papel na patogênese da periodontite apical (LINS *et al.* 2013; BARBOSA-RIBEIRO *et al.* 2016). Nesse contexto, a maioria dos estudos relacionados aos fatores de virulência de *E. faecalis* foi realizada com isolados

clínicos de infecções endodônticas persistentes/ secundárias; havendo pouca informação sobre os isolados clínicos das infecções endodônticas primárias. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar se *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas primárias apresentariam fatores de virulência que pudessem contribuir para sua persistência nos canais radiculares após o tratamento.

Para isso, isolados clínicos de *E. faecalis* foram comparados com a cepa ATCC 29212 quanto à capacidade de formação de biofilme e quanto à expressão relativa de genes associados à adesão e à capacidade de formação de biofilme (*asa*, *ace* e *esp*). No presente estudo, 80% dos isolados clínicos foram formadores de biofilme (exceção da cepa 25.1). Esses dados são semelhantes aos achados prévios de amostras de infecções secundárias (WANG *et al.* 2012) e de isolados de infecções sistêmicas (MOHAMED *et al.* 2007). Esses dados sugerem que a formação de biofilme por *E. faecalis* pode permitir a bactéria resistir ao efeito bactericida de substâncias antimicrobianas utilizadas durante o tratamento endodôntico e contribuir para o insucesso do tratamento.

A relação estabelecida na Figura 6 entre a presença dos genes nas cepas pesquisadas (6B) e os volumes dos biofilmes (6A) produzidos por elas, mostra que a cepa 25.1 foi a que produziu biofilmes com menores volumes e, também, não apresentou em seu código genético os genes *asa* e *esp*. Provavelmente, a falta destes dois importantes genes relacionados com a adesão/agregação nestas bactérias dificultou a produção de biofilmes por esta cepa.

A formação de biofilme por *E. faecalis* é dependente de múltiplos fatores genéticos. O conhecimento do número de fatores genéticos envolvidos na formação do biofilme tem aumentado nos últimos anos com o desenvolvimento dos métodos moleculares (MOHAMED *et al.* 2007; BALLERING *et al.* 2009). Recentemente, foram descritos 68 genes que podem estar envolvidos na formação de biofilme por *E. faecalis*, deixando clara a necessidade de maiores pesquisas para permitir um melhor entendimento da regulação da produção do biofilme. Entre esses genes, o *esp* (*enterococcal surface protein*) é um gene bastante estudado nos isolados de infecções sistêmicas. A proteína de adesão de superfície *esp* foi primeiramente descrita por Shankar *et al.* (1999) onde o gene *esp* foi identificado em uma ilha de patogenicidade (PAI) de uma cepa clínica de *E. faecalis*. Essa proteína de superfície

tem como principal função participar na formação de biofilme do *E. faecalis*, podendo estar relacionado à colonização e persistência bacteriana durante a infecção (SHANKAR *et al.* 2001; TOLEDO-ARANA *et al.* 2011). Este tem sido preferencialmente detectado em cepas de *E. faecalis* derivadas de infecções, mas não em outras espécies enterocócicas menos patogênicas, sugerindo fortemente um papel de *esp* na patogênese de *E. faecalis* (TENDOLKAR *et al.* 2004). O gene *esp* está presente em alta prevalência em isolados de infecções sistêmicas e de infecções endodônticas persistentes/ secundárias (PENAS *et al.* 2013). Da mesma forma, o presente estudo revelou uma alta prevalência de *esp* em isolados de infecções endodônticas primárias (4/5, 80%). Todas as amostras clínicas estudadas que formavam biofilme também apresentavam o gene *esp*. Esses dados estão de acordo com os achados de Toledo-Arana *et al.* (2001), que obteve uma associação entre a presença do gene *esp* e a habilidade de produzir biofilme *in vitro*. Os resultados do presente estudo revelaram um aumento na expressão desse gene nas amostras em biofilme quando comparadas às amostras nas formas planctônicas. Esses achados confirmam estudos prévios que revelaram que a expressão do gene *esp* estava relacionada à produção de maior quantidade de biofilme (ROSA *et al.* 2006; MOHAMED *et al.* 2004).

A proteína de superfície Ace é responsável pela adesão ao colágeno I e IV da dentina (NALLAPAREDDY *et al.* 2000; COHEN *et al.* 2013). A presença do gene *ace* tem sido associada ao aumento da adesão da bactéria à dentina do canal radicular (HUBBLE *et al.* 2003; BARBOSA-RIBEIRO *et al.* 2016). Neste estudo, apesar do gene *ace* estar presente em todas as amostras pela reação de PCR, não houve um aumento da sua expressão quando comparamos os isolados clínicos, nas formas planctônicas ou em biofilmes, com a cepa ATCC 29212. Esse achado pode estar relacionado, entre outros fatores, ao tempo de formação do biofilme (7 dias). Para testar essa hipótese, o experimento de biofilme foi repetido no tempo de 24 h. Entretanto, a expressão desse gene também não foi detectada neste tempo estudado. Esses dados sugerem que o gene *ace* deve estar relacionado à adesão inicial ao colágeno, mas não parece contribuir para o crescimento do biofilme. Estudos relataram um aumento da expressão do gene *ace* na fase exponencial e uma diminuição na fase estacionária (HALL *et al.* 2007; PINKSTON *et al.* 2011). Futuros estudos devem ser realizados com um menor tempo de adesão, a qual

estaria relacionada à fase exponencial de crescimento da bactéria (4 horas). Os resultados da expressão gênica de *ace* também podem estar associados às condições de crescimento da bactéria. No presente estudo, as amostras de *E. faecalis* foram cultivadas em 37°C, de acordo com estudos prévios (HUBBLE *et al.* 2003). Entretanto Nallaperedy *et al.* (2000) encontraram a expressão desse gene somente quando a bactéria crescia a 46°C e não a 37°C.

A expressão do gene *ace* também pode estar relacionada à interação com outros genes de *E. faecalis*. Pinkston *et al.* (2011) relataram que a diminuição da expressão de *ace* durante a fase estacionária mostrou-se dependente de um processo de pós-tradução mediado pela gelatinase (gelE), que desloca o gene *ace* da superfície da célula (NALLAPAREDDY *et al.* 2000; PINKSTON *et al.* 2011). Sendo assim, somente as cepas que não tem uma expressão significativa do gene gelE irão manter o gene *ace* ativo em sua superfície (PINKSTON *et al.* 2011; COHEN *et al.* 2013). Considerando estudos prévios que mostraram uma alta prevalência do gene gelE em amostras endodônticas (SEDGLEY *et al.* 2005; REYNAUD *et al.* 2007), é possível que este fator possa ter influenciado os resultados do presente estudo. Futuras pesquisas devem analisar a presença do gene gelE nas amostras clínicas de infecções primárias analisadas neste estudo e sua relação com a expressão gênica de *ace*.

Agregador de substâncias (*asa*) é uma adesina bacteriana responsável pela interligação dos micro-organismos, através de feromonas e reguladores químicos, facilitando a troca de plasmídeos entre as bactérias. O gene *asa*, assim como *ace* também é considerado um mediador de adesão à matriz extracelular protéica, incluindo colágeno tipo I (BARBOSA-RIBEIRO *et al.* 2016). O resultado da expressão do gene *asa* foram semelhantes aos do gene *ace*. Como discutido acima, as condições experimentais de crescimento de biofilme, que foi um biofilme mono-espécie de 7 dias, podem ter tido influência direta nos resultados encontrados no presente estudo. Dessa forma, a expressão de fatores de adesão pode ter sofrido alterações pelas condições de crescimento e pela ausência da troca genética com outros micro-organismos. Esses dados ressaltam a necessidade de desenvolvimento de modelos experimentais de biofilme incluindo múltiplas espécies em condições que mimetizem as condições clínicas em que os biofilmes orais se desenvolvem.

Em relação aos experimentos desenvolvidos com os isolados clínicos de *E. faecalis*, podemos concluir que a maioria das amostras das infecções endodônticas primárias foram formadoras de biofilme, podendo ser este um fator importante para a persistência bacteriana nos canais radiculares após o tratamento. O gene *esp* foi frequentemente detectado nessas amostras e sua expressão foi aumentada nas condições de biofilme.

O presente estudo também avaliou a prevalência, a quantidade e a atividade metabólica de *E. faecalis*, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA, antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção. A mesma amostra do canal foi utilizada para extração de DNA e RNA, permitindo uma comparação direta entre os métodos. Esse estudo mostra-se inovador por utilizar a razão rRNA/rDNA para avaliar a atividade metabólica de *E. faecalis*, uma espécie bacteriana comum em infecções persistentes após as terapias utilizadas durante o tratamento endodôntico. Na análise de qPCR baseada em rRNA e rDNA, os procedimentos endodônticos não promoveram redução do número de células bacterianas nem de seu metabolismo.

O presente estudo revelou que a reação de qPCR baseada em rRNA (RT-qPCR) promoveu uma maior taxa de detecção de *E. faecalis* do que o ensaio baseado em rDNA. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram uma alta sensibilidade dos métodos baseados em rRNA, tendo em vista que o número de rRNA em células metabolicamente ativas é maior que o número dos seus respectivos genes (rDNA) (MATSUDA *et al.* 2007; PITKANEN *et al.* 2013; PINHEIRO *et al.* 2015). Em comparação ao ensaio de RT-qPCR, a qPCR baseada em rDNA apresentou uma especificidade equivalente ao método de rRNA, demonstrando que o rDNA detectado nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos eram de células viáveis de *E. faecalis*. Esse dado foi semelhante ao encontrado na análise de Pinheiro *et al.* (2015) após o preparo biomecânico dos canais radiculares, confirmando que essas espécies bacterianas podem persistir viáveis nos canais radiculares após os procedimentos de desinfecção. Por outro lado, em estudo prévio da análise da viabilidade de *Streptococcus* spp. (PRADO *et al.* 2014), a especificidade do método baseado em rDNA foi baixa, uma vez que promoveu a detecção de rDNA em casos negativos para o rRNA; demonstrando que rDNA de *Streptococcus* spp. mortos havia sido detectado após o tratamento. Esses

dados sugerem que o método baseado em rRNA se torna uma ferramenta importante para monitorar a eficácia dos procedimentos endodônticos sobre as bactérias persistentes. Considerando que a condição das espécies bacterianas após o tratamento pode variar de células inativas a células com alta atividade metabólica, o uso de métodos moleculares baseados em rRNA podem ser vantajosos para elucidar potenciais agentes etiológicos das infecções endodônticas persistentes.

Rôças e Siqueira (2010) identificaram bactérias utilizando a reação de transcrição reversa (RT) e reação de hibridização DNA-DNA de captura reversa. A diferença entre os estudos deve estar relacionada à sensibilidade dos métodos moleculares utilizados. No presente estudo, o limite de detecção da reação de qPCR foi de 10 cópias de cDNA ou DNA por microlitro, enquanto o limite de detecção do método de hibridização DNA-DNA reportado por Rôças e Siqueira (2010) foi de aproximadamente 10^5 bactérias.

Nos ensaios moleculares realizados para identificar a prevalência, *E. faecalis* foi detectado em 10% (3/30) e 43,4% (13/30) das amostras S1 utilizando qPCR baseado em rDNA e rRNA, respectivamente. Nas amostras S2 e S3, *E. faecalis* foi detectado em 3,4% (1/30) das amostras utilizando o método baseado em rDNA e em 20% (6/30) pelo método baseado em rRNA. A taxa de detecção de *E. faecalis* foi maior pelo método baseado em rRNA quando comparado ao método baseado em rDNA nas amostras iniciais (S1) dos canais radiculares de infecções primárias ($P < 0,05$).

Considerando que o número de rRNA transcritos por células é dependente do estado metabólico das bactérias (CAMPBELL *et al.* 2011), a razão entre o número de cópias de rRNA sobre o número de cópias de rDNA foi utilizada para analisar o metabolismo de *E. faecalis* no presente estudo. Essa análise revelou que o número de cópias de rRNA foi mais elevado do que o número de cópias rDNA, indicando que *E. faecalis* permaneceu metabolicamente ativo nas infecções persistentes após o preparo biomecânico e medicação intracanal. Os dados da razão rRNA/rDNA de *E. faecalis* no presente estudo estão de acordo com os resultados prévios da atividade metabólica de após os procedimentos endodônticos (PINHEIRO *et al.* 2015). Esses dados corroboram com estudos prévios que utilizaram métodos moleculares baseados em rDNA e métodos dependentes da

cultura, confirmando a participação de bactérias Gram-positivas nas infecções endodônticas persistentes (SIQUEIRA *et al.* 2008). Entretanto, é importante ressaltar que o método RT-qPCR apresenta uma maior sensibilidade para a detecção de bactérias que o ensaio de qPCR baseado em DNA; que, por sua vez, é mais sensível que método de cultura (FIDGOR *et al.* 2007; PINHEIRO *et al.* 2015). A grande sensibilidade dos métodos moleculares baseados em rRNA pode se tornar importante na análise de amostras dos canais radiculares após os procedimentos de desinfecção, pois estes possuem um número limitado de bactérias. Além disso, essas bactérias persistentes podem estar presentes nos canais radiculares em um estado viável mas não cultivável. Esse método pode se tornar ainda mais valioso para análise da suscetibilidade de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo aos procedimentos antibacterianos utilizados durante o tratamento endodôntico.

Considerando que a infecção pós-tratamento é de natureza polimicrobiana, a composição da microbiota que permanece metabolicamente ativa após os procedimentos endodônticos de desinfecção necessita ser estudada. Bactérias apresentam diferenças na suscetibilidade aos métodos de desinfecção; e, somente após a identificação dos sobreviventes, seria possível a proposição de estratégias destinadas à sua eliminação. Esse estudo revelou que *E. faecalis* é uma dessas bactérias persistentes, corroborando com estudos anteriores, onde avaliaram a atividade metabólica de *E. faecalis* em infecções secundárias (PINHEIRO *et al.* 2010; PINHEIRO *et al.* 2015), porém tem a limitação de ter estudado somente uma espécie bacteriana. Futuros estudos necessitam ser realizados para um maior conhecimento dessa microbiota persistente. As espécies bacterianas mais frequentemente encontradas nas amostras após tratamento podem ser um fator de risco para persistência da doença; no entanto, esse fato ainda precisa ser determinado por estudos longitudinais para avaliar seu impacto na taxa de sucesso clínico do tratamento.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os achados do presente estudo mostraram que:

- Há variações na presença de fatores de adesão/coagregação (genes *ace*, *asa* e *esp*) no genoma das diferentes cepas da mesma espécie, podendo estes genes estarem relacionados entre si para maior virulência. Dos genes estudados, o *esp* parece estar relacionado com maior biovolume de biofilme, uma vez que sua expressão aumenta nesta condição.
- O método baseado em rRNA é mais sensível que o método baseado em rDNA para a detecção de *E. faecalis* em amostras dos canais radiculares. O uso de rRNA e rDNA neste estudo permitiu avaliar a atividade metabólica calculando a razão rRNA/rDNA, que revelou que *E. faecalis* se manteve metabolicamente ativo nas amostras de canais radiculares após o preparo biomecânico e medicação intracanal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Andrade FB De, Paola M, Arias C, Garcia A, Maliza A, Antonio M, et al. dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests : standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. 2015;23(6):591–8.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. Enterococcus faecalis Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants. J Endod. 2009;35(5):711–4.

Ayre WN, Melling G, Cuveillier C, Natarajan M, Roberts JL, Marsh LL, et al. crossm Enterococcus faecalis Demonstrates Pathogenicity through Increased Attachment in an Ex Vivo Polymicrobial Pulpal Infection. 2018;86(5):1–14.

Ballering KS, Kristich CJ, Grindle SM, Oromendia A, Beattie DT, Dunny GM. Functional genomics of enterococcus faecalis: Multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. J Bacteriol. 2009;191(8):2806–14.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. antification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. J Endod. 2016;42(4):552–6.

Basmaci F, Öztan MD, Kiyan M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing E. faecalis within root canals. Int Endod J. 2013;46(9):823–30.

Belgrader P, Hansford D, Kovacs GTA, Venkateswaran K, Mariella R, Milanovich F, et al. A Minisonicator To Rapidly Disrupt Bacterial Spores for DNA Analysis. 1999;71(19):4232–6.

Beomidehagh M, Mohammad Ahangarzadeh Rezaee KG, Jafari F, Hasani A, Alizadeh N, Tanomand A, et al. Effect of acidic and alkali shocks on expression of efaA gene in Enterococcus faecalis, isolated from root canal infection. 2018;(October).

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. J Endod. 2010;36(1):70–7.

Cheung H, Ho H. Microbial flora of root canal – treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. 2001;(31):332–7.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2008;41(10):873–82.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2008;41(10):873–82.

Cohen AL V., Roh JHSRNMH, Murra BE. NIH Public Access. 2014;71(11):3831–40.

Dasilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod*. 2013;39(2):249–53.

de Andrade Ferreira FB, Campos Rabang HR, Pinheiro ET, Gad??-Neto CR, Zaia AA, Randi Ferraz CC, et al. Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;102(4):564–70.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. 2002;(7).

Donlan and costeron. 28818.Pdf. *Clin Microbiol*. 2002;15(2):167–93.

E. K. SIREN, M. P. P. HAAPASALOa, K. RANTA PS& ENJK. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. 1997;91–5.

Egan MW, Spratt DA, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. 2002;321–9.

Fard MJK, Sadegh M, Pourhashemi SJ, Afkhami F, Salehi Y. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Dent [Internet]*. 2015;43(12):1573–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2015.08.012>

Figdor D, Jk D, Starvation SG. Starvation survival , growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. 2003;234–9.

Giardino L, DEL Fabbro M, Cesario F, Fernandes FS, Andrade FB. This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting , typesetting , pagination and proofreading process , which may lead to differences between this version and the Version of Record . Ple. :0–3.

Gomes BPFA, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. 2015;1–10.

Gomes BPFA, Sato E, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. 2003;604–9.

Hall AE, Gorovits EL, Syribeys PJ, Domanski PJ, Ames BR, Chang CY, et al. Monoclonal antibodies recognizing the *Enterococcus faecalis* collagen-binding MSCRAMM Ace: Conditional expression and binding analysis. *Microb Pathog*. 2007;43(2):55–66.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95–108.

Hancock H, Sigurdsson A, Trope M MJ. ORAL SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. 2001;91(5):579–86.

Harmsen HJM, van der Mei HC, Waar K, Busscher HJ, Degener JE. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. *Microbiology*. 2015;148(6):1863–70.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. 1994;986–94.

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(2):121–6.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. 1994;(4):462–78.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1965;20(3):340–9.

Lappin-scott HM. Jenkinson 2001 Biofilms adhere to stay. 2001;9(1):9–10.

Lins RX, Hirata Junior R, Lewis MAO, Wilson MJ, Williams DW, Fidel RAS, et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary

endodontic infections. J Dent [Internet]. 2013;41(9):779–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2013.07.004>

Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. International Endodontic Journal, 2001; 34 (08), 399–405.

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

Mohamed JA, Huang W, Murray BE, Nallapareddy SR, Teng F. Influence of Origin of Isolates, Especially Endocarditis Isolates, and Various Genes on Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 2005;73(10):7075–7075.

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect Immun. 2000;68(9):5218–24.

Nóbrega L, F M, AC R, MA M, BP G. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. 2016;30(1):1–9.

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

Penas PP, Mayer MPA, Gomes BPFA, Endo M, Pignatari ACC, Bauab KC, et al. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. J Endod. 2013;39(7):858–64.

Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira R, Shin RC, Mayer PA. RNA-based Assay Demonstrated *Enterococcus faecalis* Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. 2015;1–4.

Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira R, Shin RC, Mayer PA. RNA-based Assay Demonstrated *Enterococcus faecalis* Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. 2015;1–4.

Pinheiro ET, Gomes BPF a, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia a a, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:100–3.

Pinkston KL, Gao P, Diaz-Garcia D, Sillanpää J, Nallapareddy SR, Murray BE, et al. The Fsr quorum-sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display

of the collagen-binding MSCRAMM Ace through regulation of gelE. J Bacteriol. 2011;193(17):4317–25.

Portenier I, Dds TW, Dds DØ. The Susceptibility of Starved , Stationary Phase , and Growing Cells of Enterococcus faecalis to Endodontic. 2005;31(5):380–6.

Reynaud Af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Røslie E, Peciuliene V, et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic Enterococcus faecalis isolates. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(2):87–94.

Reynaud Af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Røslie E, Peciuliene V, et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic Enterococcus faecalis isolates. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(2):87–94.

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.

Rôças IN, Siqueira JF, Aboim MCR, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2004;98(6):741–9.

Rodrigues CT, Andrade FB De, Vasconcelos LRSM De, Midena RZ. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against Enterococcus faecalis biofilm and infected dentinal tubules. 2018;901–11.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, Kenzie DMAC, Coldero L, et al. Molecular Identification of Microorganisms from Endodontic Infections. 2001;39(9):3282–9.

Rosa R, Arciola CR, D'Amelio R, Creti R, Venditti M, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium . FEMS Microbiol Lett. 2006;256(1):145–50.

Ryu H, Elk M, Hokaja A, Siponen S, Domingo JWS. Detection of Fecal Bacteria and Source Tracking Identifiers in Environmental Waters Using rRNA-Based RT-qPCR and rDNA-Based qPCR Assays Tarja Pitkanen. 2013;

Ryu H, Elk M, Hokaja A, Siponen S, Domingo JWS. Detection of Fecal Bacteria and Source Tracking Identifiers in Environmental Waters Using rRNA-Based RT-qPCR and rDNA-Based qPCR Assays Tarja Pitkän. 2013;

Sedgley C, Lennan S AO. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Int Endod J*. 2005;38:735–42.

Sedgley C, Lennan S AO. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Int Endod J*. 2005;38:735–42.

Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*. 2006;39(11):878–85.

Shankar N, Lockatell C V., Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*. 2001;69(7):4366–72.

Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in esp, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun* [Internet]. 1999;67(1):193–200. Available from: <http://iai.asm.org/content/67/1/193.abstract> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96296/pdf/ii000193.pdf>

Siqueira JF, Rôças IN. A 16S rDNA-based nested PCR protocol to detect *Campylobacter gracilis* in oral infections. 2003;17(2):142–6.

Siqueira JF, Rocas IN. Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res* [Internet]. 2009;88(11):969–81. Available from: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034509346549>

Siqueira JF, Rocas IN. Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res* [Internet]. 2009;88(11):969–81. Available from: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034509346549>

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 1998;85(1):86–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210498904048>

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral*

Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology [Internet]. 1998;85(1):86–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210498904048>

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2004;72(10):6032–9.

Toledo-arana A, Valle J, Solano C, Cucarella C, Lamata M, Amorena B. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in. *Society*. 2001;67(10):4538–45.

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* [Internet]. 2011;37(5):631–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.006>

Wilson CE, Cathro PC, Rogers AH, Briggs N, Zilm PS. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod J*. 2015;48(3):210–9.

Zancan RF, Vivan RR, Ribeiro M, Lopes M, Weckwerth PH, Andrade FB De. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. 2016;1–7.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do estudo: Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA

Pesquisador responsável: Ericka Tavares Pinheiro

Equipe de pesquisa: Prof. Dr. Giulio Gavini, Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, Alexandre Pinheiro Lima de Carvalho, Carlos Goes Nogales, Laura Cristina Leite Nardello, Fernanda Pinheiro Bruno, Luiza Riomar Paz, Roberto Xavier Romero Cazares, Bárbara Guedes Alves.

Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo – Departamento de Dentística

Telefone para contato: (11) 3091-7839 / (11) 2648-8293

Local da coleta de dados: Clínica da Pós-Graduação da FOU SP

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA”** que tem como objetivo avaliar o quanto a agitação da solução irrigadora por ultrassom, laser ou instrumento endodôntico consegue diminuir o número de bactérias encontradas no canal radicular.

A pesquisa será realizada na Clínica da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e serão selecionados pacientes da Clínica de Endodontia da FOU SP já em tratamento.

O procedimento consiste em, detectada no exame clínico e radiográfico a infecção do canal, estes pacientes serão convidados a participar da pesquisa permitindo a coleta do conteúdo que está dentro do canal durante todo o tratamento para a pesquisa. Os demais serão encaminhados para outras disciplinas para que possam ser realizados os tratamentos necessários.

O tratamento consiste em duas sessões, sendo que a primeira será feita o procedimento relacionado com o tratamento de canal, com o uso ou não da agitação da solução irrigadora e as coletas. Na segunda sessão, será feito o fechamento do canal, uma nova coleta e restauração do dente, finalizando o tratamento. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento. Anualmente o participante da pesquisa retornará à Clínica de Endodontia para controle do tratamento.

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

1/3

Os participantes da pesquisa serão divididos em 4 grupos: 1 – Seringa plástica descartável e pontas de irrigação; 2 – Agitação da solução irrigadora com ultrassom; 3- Agitação com instrumento endodôntico; 4- Agitação da irrigação a laser.

O risco deste tratamento é uma sensibilidade após as consultas de tratamento, que o pesquisador responsável estará à inteira disposição para solucionar. O benefício ao participante da pesquisa será o tratamento de canal garantindo melhor saúde bucal.

Aos participantes desta pesquisa são assegurados:

- Ressarcimento de todos os gastos;
- Assistência em virtude dos danos decorrentes da pesquisa;
- Indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa;
- Acesso aos resultados dos exames radiográficos;
- Os dados fornecidos serão confidenciais;
- Liberdade de retirada do Consentimento sem penalização por parte dos pesquisadores;
- Liberdade de recusar em participar do estudo sem penalização por parte dos pesquisadores responsáveis;
- Em caso de interrupção do estudo receberá assistência adequada de forma gratuita pelo tempo que for necessário;

O pesquisador responsável, Ericka Tavares Pinheiro, poderá ser encontrado no telefone (11) 2648-8293, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisadores é: de segunda a sexta-feira das 9 as 12h e de 14 as 16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

2/3

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo uma do participante da pesquisa e outra do pesquisador responsável.

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Nome do participante da pesquisa:

Endereço: _____
_____ Telefone: (_____)

Assinatura do Participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE B – Coletas Microbiológicas dos Canais Radiculares

Para realização das coletas microbiológicas dos canais radiculares, é necessário realizar inicialmente um protocolo de desinfecção do campo operatório, seguindo os passos descritos abaixo:

1. Após a anestesia do dente, realizar o isolamento absoluto com lençol de borracha, grampo metálico e barreira gengival.
 2. Com uma broca esférica diamantada, montada em motor de alta-rotação, remover todo o material restaurador (definitivo e temporário), tecido cariado e esmalte sem suporte de dentina, evitando trepanar a câmara pulpar. Utilizar apenas irrigação com soro fisiológico estéril através de seringa descartável.
 3. Com um swab estéril, realizar a desinfecção do campo operatório com água oxigenada 30% de forma excêntrica, iniciando pela coroa dentária em direção ao arco de isolamento.
 4. Com outro swab estéril, proceder da mesma forma com a solução de NaOCl 2,5%.
 5. Concluir a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e soro fisiológico.
 6. Realizar nova desinfecção do campo com água oxigenada 30% e NaOCl 2,5%.
 7. Neutralizar o NaOCl 2,5% com um swab embebido em tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto.
 8. Com um cone de papel estéril, coletar uma amostra do ângulo cavo-superficial da cavidade de acesso (controle de assepsia do campo operatório).
-

Após o protocolo de desinfecção do campo operatório, realiza-se a coleta microbiológica dos canais radiculares com os procedimentos descritos a seguir:

1. Com auxílio de seringa descartável e agulha endodôntica de 30G Endo-EZE (Ultradent Products Inc), preencher o canal radicular com soro fisiológico estéril.
2. Aspirar a solução da câmara pulpar, mantendo somente a solução no interior do canal radicular.
3. Introduzir uma lima10 tipo K e realizar a odontometria com o localizador foraminal eletrônico. Introduzir uma lima 15 tipo H até o comprimento real de trabalho (CRT) e, com movimentos suaves de limagem contra as paredes, suspender o conteúdo microbiano da dentina na solução.
4. Com auxílio de uma pinça hemostática, fraturar as limas K e H (entre a parte ativa e a porção intermediária) e depositar a parte ativa da lima em um microtubo de 1,5mL contendo solução de transporte RNA later.
5. Introduzir um cone de papel número 15 até o CRT, mantendo-o em posição por 1 minuto. Repetir o procedimento de coleta com 4 novos cones de papel, mantendo-os individualmente no CRT por 1 minuto cada.
6. Depositar estes cones no mesmo microtubo no qual foi depositada a parte ativa da lima.
7. Congelar as amostras em freezer -20°C até o término do tratamento endodôntico do dente, quando será realizada a extração de DNA/RNA de todas as amostras do dente em estudo.

OBSERVAÇÃO: Nas coletas realizadas após o uso de alguma substância química, deve-se neutralizar a substância e secar o canal antes de se proceder com os procedimentos de coleta.

APÊNDICE C – Procedimentos Laboratoriais**1) EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS**

A extração dos ácidos nucleicos das amostras dos canais radiculares foi realizada com o kit comercial *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com os passos descritos a seguir:

1. Manter os microtubos contendo as amostras dos canais radiculares no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte.
 2. Homogeneizar cada amostra em agitador de tubos (vortex) durante 1min.
 3. Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000 RPM por 10min.
 4. Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 2µL de Proteinase K (*MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*), em volume necessário para a quantidade de amostras a serem analisadas (MIX-1).
 5. Remover as amostras da centrífuga e descartar o sobrenadante mantendo o pellet.
 6. Adicionar 300µL do MIX-1 aos tubos contendo as amostras.
 7. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
 8. Aquecer as amostras em banho-maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de tubos (10s) a cada 5min.
 9. Esfriar as amostras em gelo por 5min.
 10. Adicionar 150µl de *MPC Protein precipitation reagent* (*MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*) aos tubos contendo as amostras.
 11. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
 12. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min.
 13. Transferir o sobrenadante para microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet.
 14. Adicionar mais 25µl de *MPC Protein precipitation reagent* a cada amostra.
 15. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
 16. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min.
 17. Transferir o novo sobrenadante para novos microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet.
 18. Adicionar 500µL de isopropanol 100% a cada microtubo e invertê-los 30/40 vezes.
-

19. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min.
20. Descartar o isopropanol, com pipetas e ponteiras de 1000μL, com o cuidado de não remover o pellet.
21. Acrescentar 500μL de etanol 70% ao pellet.
22. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s.
23. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 5min.
24. Retirar parte do etanol 70%, deixando apenas cerca de 50μL no fundo do microtubo.
25. Centrifugar novamente a 4°C e 13.000RPM por 5min.
26. Remover totalmente o etanol 70% com ponteiras de 200μL.
27. Manter os tubos abertos em temperatura ambiente para evaporar o remanescente de etanol.
28. Adicionar 35μL de *TE Buffer (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* em cada amostra.
29. Hidratar as amostras por 10 minutos, mantendo-as no gelo ou no Thermomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 4°C.
30. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

2) DIVISÃO DAS AMOSTRAS DE DNA E RNA

1. Dividir as amostras em 2 microtubos:
 - a. 17,5μL em um microtubo denominado com o número da amostra + RNA
 - b. 17,5μL em um microtubo que ficará destinado a portar o DNA.
2. Guardar o microtubo do DNA no freezer -20°C e prosseguir com a purificação do RNA.

3) PURIFICAÇÃO DO RNA

1. Em um microtubo limpo, misturar 2μL de DNase I e 2μL de 10X *DNase I Reaction Buffer (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* para cada amostra de RNA.
 2. Aguardar 30 min em temperatura ambiente para degradar o DNA.
-

3. Adicionar 200µL de 2x *T&C Lysis Solution (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* e colocar no agitador de tubos por 5s.
4. Manter no gelo 5min.
5. Adicionar 200µL de *MPC Protein precipitation reagent (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* aos tubos contendo as amostras.
6. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
7. Centrifugar (4°C, 13.000RPM) por 10min.
8. Transferir o sobrenadante para microtubos limpos e devidamente identificados conforme a amostra e descartar o pellet.
9. Adicionar 500µL de isopropanol e inverter as amostras 30-40 vezes.
10. Centrifugar (4°C, 13.000RPM) por 10min.
11. Retirar o isopropanol sem deslocar o pellet.
12. Lavar o pellet com 500µL de etanol 70%.
13. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5min.
14. Retirar o etanol 70% mantendo cerca de 50uL no fundo da microtubo.
15. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5 min.
16. Secar o etanol 70% com uma ponteira de 200µL.

4) SEGUNDO PROCESSO DE LISE DO DNA

Realiza-se este segundo processo de lise para garantir que todo o DNA seja extraído das amostras de RNA.

1. Acrescentar em cada tubo 1uL de DNase I, Amp Grade, 1 U/µL (Invitrogen) , 1uL 10X DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) e 10uL de DEPC – treated water (Invitrogen) .
 2. Encubar as amostras por 15 min em temperatura ambiente.
 3. Inativar a DNase com a adição de 1µL de EDTA 25mM (Invitrogen).
 4. Levar ao banho-maria a 65° C por 10 minutos. As amostras estão prontas para serem utilizadas na reação de transcrição reversa. Antes da confecção do cDNA, foi realizado a reação de PCR convencional utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* para conferir se todo o DNA das amostras foi removido após o tratamento das amostras com DNase I.
-

5. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

5) PCR CONVENCIONAL

A reação descrita a seguir foi padronizada para detecção de DNA bacteriano com uso de iniciadores universais específicos para o domínio *Bacteria*: *forward*, 5'-GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG-3'; *reverse*: 5'- GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA-3' (Paster et al. 2001). O volume total de cada reação foi de 50µL, contendo: 1 µL de cada primer, 5µL de tampão para PCR (PCR Buffer, Life Technologies Corp), 1,5 µL de Mg₂ (Life Technologies Corp), 4µL de 2,5mM dNTP (Life Technologies Corp), 0,5µL de Taq DNA polimerase (Life Technologies Corp), 36 µL de água ultrapura (Ultrapure water, Life Technologies Corp) e 1 µL de DNA/RNA. A reação de PCR foi realizada no termociclador GeneAmp 2720 (Thermofisher), com o aquecimento inicial a 94°C por 4 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 s, 60°C por 45 s e 72°C por 1,5 min; finalizados com 72°C por 15 min.

6) PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

A reação de RT-PCR foi realizada com o kit comercial *Superscript III First-Strand* para confeccionar a fita dupla de cDNA a partir do RNA purificado da amostra. As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, que serão descritas a seguir:

1. Misturar os seguintes reagentes, para cada amostra: 7 µL de RNA, 1µL de *Random Hexamer*, 1µL de dNTP e 1µL de água DPEC.
 2. Incubar no banho-maria a 65°C por 5 min.
 3. Incluir no gelo por 1 min.
 4. Misturar os seguintes reagentes para preparar um MIX: 2µL de *Buffer*, 4µL de MgCl, 2µL de DTT, 1µL de RNase OUT e 1µL de *SuperScript III*.
 5. Distribuir 10 µL do MIX nos microtubos contendo as amostras e agitar levemente.
 6. Colocar as amostras no termociclador GeneAmp 2720 (Thermofisher), utilizando o ciclo: 25° por 10 min, 50° por 50 min e 85° por 5 min.
 7. Adicionar 1uL de RNaseH e incubar por 20 minutos na estufa a 37°C
-

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA

Pesquisador: Ericka Tavares Pinheiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71367517.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.201.768

Apresentação do Projeto:

Este projeto pretende avaliar o efeito de diferentes métodos de desinfecção em dentes com periodontite apical. Serão selecionados 100 pacientes com necrose pulpar e periodontite apical. Coletas microbiológicas dos canais radiculares serão realizadas no início do tratamento endodôntico (S1) e após o preparo químico-mecânico com Sistema Reciproc e NaOCl 2,5% (S2). A seguir, os pacientes serão igualmente divididos em grupos de acordo com procedimentos complementares de desinfecção realizados após o preparo químico-mecânico: Grupo XP (XP-endo Finisher), Grupo PIPS (irrigação

ativada a laser utilizando as pontas PIPS (Photon-Induced Photoacoustic Streaming), Grupo PUI (irrigação ultrassônica passiva) e Grupo IC (irrigação convencional com seringas, sem ativação). Novas coletas microbiológicas dos canais radiculares serão feitas após os procedimentos complementares de desinfecção (S3) e após a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 14 dias (S4) e re-instrumentação dos canais radiculares antes da obturação (S5). As amostras dos canais radiculares serão submetidas à extração dos ácidos nucleicos totais. O efeito dos protocolos de tratamento sobre a microbiota total será determinado por qPCR baseada em rDNA, utilizando iniciadores universais para o Domínio Bacteria.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO

Continuação do Parecer: 2.201.768

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a eficácia antimicrobiana de diferentes protocolos clínicos de desinfecção endodôntica e também analisar a diversidade e atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes ao tratamento endodôntico convencional e os benefícios diretos aos pacientes são o tratamento de canal realizado e a possível diminuição da infecção do dente, colaborando para uma melhor saúde bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, que pode indicar melhores métodos de tratamento endodôntico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas as informações básicas do projeto, o projeto detalhado, o TCLE e a folha de rosto, estando todos conformes.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_888126.pdf	17/07/2017 13:33:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	17/07/2017 13:32:33	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito
Cronograma	cronogramadeduracaodapesquisa.docx	17/07/2017 13:32:11	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO

Continuação do Parecer: 2.201.768

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentolivreeesclarecido.pdf	14/06/2017 14:54:21	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Ericka_2017.pdf	16/05/2017 16:25:28	Laura Cristina Leite Nardello	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br