



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - FOP

PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE *ENTEROCOCCUS*
FAECALIS ISOLADOS DE DENTES ASSOCIADOS AO INSUCESSO
DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO**

PIRACICABA

2018

PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE *ENTEROCOCCUS
FAECALIS* ISOLADOS DE DENTES ASSOCIADOS AO INSUCESSO
DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Cirurgião Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Coorientadora: Priscila Amanda Francisco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO
FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO APRESENTADO PELO ALUNO PEDRO
IVO DA GRAÇA FAGUNDES E ORIENTADO PELA
PROF^a DR^a BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE
ALMEIDA GOMES

PIRACICABA

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2018/00587-5

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

F139i Fagundes, Pedro Ivo da Graça, 1992-
Investigação dos genes de virulência de *Enterococcus faecalis* isolados de dentes associados ao insucesso do tratamento endodôntico / Pedro Ivo da Graça Fagundes. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

Coorientador: Priscila Amanda Francisco.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Microbiologia. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Francisco, Priscila Amanda, 1987-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Endodontics

Microbiology

Polymerase chain reaction

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Adalberto e Pricila, minha irmã Ana Carolina e meu sobrinho Davi, pelo apoio e dedicação durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de iniciação científica no país, processo nº 2018/00587-5.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela paciência, e seu jeito especial de ensinar as pessoas, que encanta e transforma todo o ensinamento na área de endodontia em amor.

À minha Co-Orientadora Priscila Amanda Francisco, pela paciência, alegria, bom humor, e seu jeito especial de explicar tudo da melhor forma possível, sem alterar em momento algum seu tom de voz, sempre com uma risada no final de cada fala, e por sempre me acalmar nos momentos mais difíceis, dizendo: calma, vai dar tudo certo.

Aos meus pais, Adalberto e Pricila, a minha irmã Ana Carolina, ao meu sobrinho Davi, que sempre lutaram e sempre me apoiaram para eu estudar e fazer o que gosto, seguindo o meu coração, e pelo total apoio aos anos de graduação.

À minha namorada e sempre companheira Fernanda, pelo apoio em toda as minhas decisões, a paciência, as longas conversas e todo seu jeito especial de me fazer entender o que muitas vezes eu não conseguia entender.

Aos meus amigos e irmãos da saudosa república Karkavara, onde morei e vivi os melhores anos de minha vida universitária. Sempre aprendendo muito com todos os meus irmãos que levarei eternamente em meu coração.

Aos funcionários da FOP-UNICAMP e aos funcionários do laboratório de Endodontia.

RESUMO

O insucesso do tratamento endodôntico pode ser causado por falhas nas etapas do tratamento, tanto na instrumentação quanto na utilização não eficiente de substâncias irrigadoras auxiliares para a desinfecção dos canais radiculares. Além disso a complexa anatomia radicular e a falha no selamento coronário, ocasionando a penetração de microrganismos via microinfiltração desses canais, também podem ser considerados importantes fatores etiológicos. No insucesso, predominam bactérias Gram-positivas, sendo o *Enterococcus faecalis* frequentemente associado à infecção secundária/persistente. Além da alta prevalência da *E. faecalis* no insucesso, a presença de fatores de virulência nessa bactéria reforça a importância de seu estudo. Os objetivos desta pesquisa foram: a) confirmar se as cepas isoladas eram *Enterococcus faecalis* por PCR; b) verificar a presença dos genes de virulência: produção de gelatinase (gelE), proteína de superfície (esp), adesina de ligação ao colágeno (ace), ativador da citolisina (cylA) e antígeno A de *E. faecalis* (efaA), por meio de PCR. Foram utilizadas 25 cepas de *E. faecalis* previamente coletadas e isoladas pelo método de cultura utilizando meio seletivo para m-Enterococcus. A sua identificação também foi confirmada pelo método de PCR com primers específicos para essa espécie. O DNA das cepas identificadas de *E. faecalis* foram utilizados novamente para a identificação de genes de virulência (gelE, esp, ace e efaA), por meio de PCR e leitura por eletroforese em gel de agarose a 1%. O gene de virulência efaA dos isolados de *E. faecalis* foi detectado em 100% das cepas, enquanto o gelE estava presente em 84%, o ace em 68% e o esp em 56%. Conclui-se que as cepas apresentaram diferentes padrões de detecção dos genes de virulência, estando cada um deles presente em pelo menos metade dos isolados, o que revela a importância desta bactéria na patogênese e persistência da infecção endodôntica pós-tratamento.

Palavras-Chave: Endodontia. Microbiologia. Genes de virulência. PCR.

ABSTRACT

The apical periodontitis post endodontic treatment can be caused by failures in the treatment stages, as in the instrumentation, in the inefficient use of auxiliary irrigating and in the failure in coronary sealing. Without success, Gram-positive bacteria predominate, with *Enterococcus faecalis* being frequently associated with secondary/persistent infection. In addition to the high prevalence of *E. faecalis* in failure, the presence of virulence factors in this specie reinforces the importance of its study. The objectives of this research were: a) to confirm if isolated strains are of *Enterococcus faecalis* by PCR; b) to verify the presence of the virulence genes: gelatinase production (gelE), surface protein (esp), collagen binding adhesin (ace), cytolysin activator (cylA) and *E. faecalis* antigen A (efaA), by means of PCR, in these strains. Were used samples of 25 strains of *E. faecalis* previously collected and isolated by culture method using m-Enterococcus selective medium and also confirmed using the PCR method with specific primers for this specie. The DNA of strains of confirmed *E. faecalis*, were used again for the identification of virulence genes (gelE, esp, ace and efaA), by means of PCR and reading by electrophoresis in 1% agarose gel. The virulence gene efaA of *E. faecalis* isolates was detected in 100% of the strains, while, gelE were present in 84%, ace in 68%, and esp in 56%. In conclusion, the strains showed different patterns for virulence gene detection, being each of them present in at last half of the isolates, which reveals the importance this bacterium in the pathogenesis and persistence of post-treatment endodontic infection.

Key words: Endodontics. Microbiology. Virulence genes. PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Insucesso Endodôntico	12
2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.1.2 Genes de virulência	13
2.1.3 Genes de virulência estudados	14
3 PROPOSIÇÃO	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Autorização para a realização da pesquisa	17
4.2 Confirmação de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados através de técnicas moleculares (n=20)	17
4.2.1 Extração do DNA, reação de PCR utilizando primers de identificação e eletroforese	17
4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	18
4.3 Investigação dos fatores de virulência de <i>Enterococcus faecalis</i> através de técnicas moleculares	19
4.3.1 Extração do DNA, reação de PCR utilizando primers dos genes de virulência e eletroforese	19
4.4 Análise estatística	21
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS	32
Anexo 1 –Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio	32
Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP	33
Anexo 3 –Iniciação Científica	34

1 INTRODUÇÃO

Infecções endodônticas são divididas em primárias ou secundárias/persistentes, as alterações ambientais e de tempo decorrido desde o início da infecção influenciam a composição da microbiota no canal radicular. As infecções que apresentam maior carga e diversidade bacteriana são as infecções primárias, indicam a maioria dos autores. A infecção primária ocorre ao mesmo tempo à necrose do tecido pulpar, são consideradas polimicrobianas, dominadas por bactérias anaeróbias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo estas facilmente eliminadas por uma instrumentação correta dos canais radiculares (Bo-Young Hong et al., 2013; Martinho et al., 2014; Tzanetakis et al., 2015; Nóbrega et al., 2016).

Já as infecções secundárias/persistentes, representam o insucesso do tratamento endodôntico anterior e revelam uma microbiota característica diferente, tanto quantitativa quanto qualitativamente. O insucesso do tratamento endodôntico pode ser causado por algumas falhas nas etapas do tratamento, tanto na instrumentação quanto na utilização não eficiente de substâncias irrigadoras auxiliares para a desinfecção dos canais radiculares, Além disso a complexa anatomia radicular e a falha no selamento coronário, ocasionando a penetração de microrganismos via microinfiltração desses canais, também podem ser considerados importantes fatores etiológicos (Sundqvist e Figdor, 1998; Nair, 2004; Gomes et al., 2008; Siqueira et al., 2014; Tzanetakis et al., 2015).

No insucesso, predominam determinadas bactérias Gram-positivas (estritos ou facultativos), com capacidade de sobreviverem a insuficiência de nutrientes e adaptarem-se a condições ambientais inóspitas, visto que são canais radiculares que já passaram por tratamento endodôntico prévio. Os microrganismos mais prevalentes são: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *Aerococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gamella* spp. (Gomes et al., 2008; Rôças et al., 2008; Barbosa-Ribeiro et al., 2016a).

Enterococcus faecalis são bactérias que habitam o trato gastrointestinal de seres humanos e animais, estão presentes no solo, na água, em plantas e em produtos

alimentares (Medeiros et al., 2013). Esta espécie também é frequentemente associada às infecções secundárias/persistentes, sendo amplamente estudada em trabalhos relacionados ao insucesso endodôntico (Gomes et al., 1996; Barbosa-Ribeiro et al., 2016ab; Delboni et al., 2017, Siqueira et al., 2007).

Além da alta prevalência da *E. faecalis* no insucesso, a presença de fatores de virulência nessa bactéria reforça a importância de seu estudo. Tais fatores podem facilitar a aderência nas paredes dos canais radiculares e superfícies, dificultando sua remoção mesmo após a instrumentação; podem igualmente causar danos de variadas formas ao hospedeiro estimulando uma resposta exacerbada dos tecidos periapicais (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Siqueira e Rôças, 2007). Segundo Medeiro et al. (2013) e Ribeiro-Barbosa (2016b) vários genes de virulência podem ser detectados em cepas de *E. faecalis*, entre eles encontramos: o gene que codifica a proteína de superfície extracelular (esp), que é associada à parede celular e serve como adesina para a colonização do tecido do hospedeiro patogênico; o (ace) que fornece instruções para fazer a enzima de conversão de angiotensina e media a associação de bactérias a proteína da matriz de células hospedeiras, como colágeno I e IV e laminina; a substância de agregação (asa) que é necessária para o contato entre as células durante a conjugação e para a adesão a células eucarióticas; a gelatinase (gelE) que é uma metaloproteinase de zinco, que hidrolisa a gelatina, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos.

Uma ferramenta para a investigação tanto da presença de bactérias, como o *E. faecalis*, assim como de seus genes de virulência como, gelE, esp, ace, cylA, é a reação em cadeia de polimerase (PCR). O PCR é um método molecular de identificação amplamente utilizado em pesquisas onde o DNA é investigado e pode esclarecer muitas características da biologia celular de cada microrganismo. Trabalhos como os de Sedgley et al. (2005), Zhu et al. (2010), Medeiros et al. (2013) e Barbosa-Ribeiro et al. (2016) pesquisaram a presença de espécies específicas e de genes de virulência em infecções endodônticas por tal técnica molecular.

Considerando a alta prevalência de *E. faecalis* e a importância dos seus genes de virulência na patogênese e persistência da infecção endodôntica pós-tratamento, esse

trabalho visou investigar, por meio do PCR, a presença dos genes de virulência *gelE*, *esp*, *ace*, *cylA* e *efaA* nas cepas isoladas de casos de insucesso do tratamento endodôntico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insucesso Endodôntico

O tratamento endodôntico é realizado para manter o dente em função na cavidade oral. Mesmo com tantas tecnologias na área da endodontia o insucesso endodôntico pode vir a aparecer, seja por falta de uma instrumentação efetiva, deixando assim bactérias remanescentes no canal; seja por falta de uma irrigação também efetiva; uma obturação de baixa qualidade; ou a extensão excessiva ou insuficiente do selamento marginal, podendo causar microinfiltração marginal e contaminação dos canais (Tabassum & Khan 2016).

O preparo biomecânico nos tratamentos endodônticos tem por objetivo principal a eliminação ou redução de bactérias no interior dos canais radiculares, quando ocorrem falhas durante o procedimento podem surgir lesões periapicais pós-tratamento, ou seja, o insucesso do tratamento endodôntico. Podendo este ser caracterizado pela permanência de microrganismos ou pela recontaminação do sistema de canais radiculares. (Siqueira & Rôças, 2008; Siqueira et al., 2014, Francisco 2017).

Existem estudos que usam diferentes métodos para detecção de falhas em tratamentos endodônticos, estes detectaram que outros fatores, além dos que já foram citados, podem contribuir para o insucesso, como a anatomia interna, trincas apicais, fenestração apical e iatrogênias (Qian et al., 2015).

O insucesso pode ser resultado de uma terapia anterior mal conduzida. Os problemas mais comuns que podem levar ao insucesso endodôntico são: controle asséptico inadequado, abertura coronária mal delineada, canais endodônticos não detectados, anatomia radicular que foge a normalidade, instrumentação insuficiente e infiltração advindas de restaurações temporárias e permanentes (Sundqvist & Figdor, 1998, Francisco 2017).

Siqueira e colaboradores (2014) verificaram em uma revisão da literatura, que teve como um de seus objetivos estudar as causas do insucesso, que a periodontite pós-

tratamento também pode ser observada em alguns casos de dentes aparentemente bem tratados e seguindo protocolos delineados, isto devido a questões da complexa anatomia radicular, ocorrendo em 5-15% dos casos com lesão periapical pré-operatória.

2.1.1 *Enterococcus faecalis*

A espécie *Enterococcus faecalis* tem grande importância na endodontia, pois está presente na grande maioria dos canais com insucesso endodôntico. Sendo assim sua eliminação contribui grandemente para o sucesso do tratamento (Sundqvist et al., 1998; Rôças et al., 2004; Siqueira & Rôças, 2004; Willians et al., 2006; Ozbek et al., 2009a; Subramanian e Mickel, 2009; Castilho et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, capaz de suportar e sobreviver em condições extremas como falta de O₂, temperatura e pH dentro de canais radiculares (Gomes et al., 2008; Baik et al., 2011; Lee & Baek 2012).

Enterococcus faecalis geralmente sobrevivem a condições extremas, demonstrando resistência aos tratamentos que são utilizados para eliminá-las. Essa patogenicidade varia de acordo com a doença a qual eles estão relacionados, no caso de infecções de canais obturados com periodontite crônica, não há risco de vida ao paciente, porém, não há diminuição da virulência do patógeno (Ozbek et al., 2009).

2.1.2 Genes de Virulência

Os genes de virulência estão ligados às bactérias, e contribuem para a patogenicidade, cada um tem sua característica ou mesmo um pode conter várias características embutidas, como coagregar e formar biofilmes intracanais. Além de ter suas funções metabólicas os genes de virulência têm a capacidade de gerar danos ao tecido do hospedeiro. Eles atuam em combinação com vários estágios da infecção, um único gene, por exemplo, pode conter várias funções em diferentes estágios da doença endodôntica (agregação, invasão, sobrevivência e dano) (Siqueira & Rôças, 2007).

Esses genes contribuem para a patogênese do enterococco através da mediação da adesão e colonização ajudando o patógeno invadir os tecidos do hospedeiro

causando injúrias, este microrganismo interfere também na produção de enzimas tóxicas que realçam a gravidade da infecção (Strateva et al., 2016)

2.1.3 Genes de Virulência estudados

A gelatinase (gelE) é uma metaloproteinase hidrofóbica com capacidade de clivar insulina, caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina e fibrina. Sendo assim responsável pela reabsorção óssea, quando é inibida a gelatinase causa uma diminuição do processo de reabsorção óssea (Kayaoglu & Ørstavik 2004, Barbosa-Ribeiro et al., 2016).

O esp é a proteína de superfície responsável em causar adesão de biofilme nas paredes dos canais radiculares (Top et al., 2013). Essa proteína é codificada pelo gene esp e pode estar envolvida na colonização e resistência de *E. faecalis* durante infecções (Shankar et al., 2001, Barbosa-Ribeiro et al., 2016). É provável que o gene enterococcal esp, medie a interação primária do patógeno com as superfícies do hospedeiro durante a formação do biofilme (Barbosa-Ribeiro et al., 2016)

O ace é a adesina de ligação ao colágeno de *E. faecalis* que é responsável por causar também a adesão de biofilme nas paredes dos canais radiculares. Esta característica de formação de biofilme causada pelas cepas esp e ace, pode ser observada em dois estudos anteriores (Shujun Ran et al., 2013, Barbosa-Ribeiro et al., 2016).

Em ambientes hospitalares *E. faecalis* se liga a superfícies abióticas, o que contribui para uma maior prevalência de genes que codificam fatores de virulência que se envolvem na formação de biofilme, como esp e ace (Strateva et al., 2016).

Já o efaA, é o antígeno da endocardite bacteriana, apresentando um sério risco a saúde do paciente, caso não retirado dos canais radiculares durante o tratamento endodôntico. A presença do efaA relacionada a endocardite bacteriana também foi encontrada em outros estudos que relataram uma grande quantidade das cepas de efaA

em pessoas com endocardite bacteriana (Kayaoglu & Ørstavik 2004, Barbosa-Ribeiro et al., 2016).

O *cylA* pode induzir dano tecidual por meio da lise dos eritrócitos e destruição das células do hospedeiro. Na literatura observou-se que 36% das cepas endodônticas de *E. faecalis* são capazes de produzir hemolisina (Sedgley et al., 2005, Barbosa-Ribeiro et al., 2016).

Diante do que foi exposto, faz-se necessário mais estudos que buscam investigar a presença de *E. faecalis* e de seus genes de virulência nas infecções endodônticas, principalmente nos casos de insucesso.

3 PROPOSIÇÃO

Diante disto, são objetivos desta pesquisa:

- a) Confirmar se as cepas isoladas são de *Enterococcus faecalis*, por meio de PCR, com um primer específico para essa espécie;
- b) Verificar a presença dos genes de virulência gelE, esp, ace, cylA e efaA por meio do PCR, nas cepas que foram previamente confirmadas como *E. faecalis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram utilizadas amostras de 25 cepas de *Enterococcus faecalis* previamente coletadas e armazenados em freezer de -80°, por alunos do programa de Pós-graduação em odontologia, área de concentração de Endodontia, durante o retratamento do canal radicular.

Os tubos tipo eppendorfs contendo estas amostras foram descongelados em temperatura ambiente, agitados por 60s e alíquotas de 50 µL de cada uma destas cepas foram inoculadas em placas de petri contendo o meio de cultura seletivo para o cultivo de *E. faecalis*, Ágar m-Enterococcus – incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias. Após o crescimento das colônias de bactérias, as mesmas foram novamente isoladas para garantir que apenas uma cepa de cada amostra foi selecionada.

4.1 Autorização para a realização da pesquisa

A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) sob o protocolo 119/2015.

4.2 Confirmação de *Enterococcus faecalis* isolados através de técnicas moleculares (n=20)

Um total de 25 colônias de *E. faecalis*, previamente isoladas pelo método de cultura utilizando meio seletivo m-Enterococcus foram também identificadas através de métodos moleculares utilizando primers de *E. faecalis*.

4.2.1 Extração do DNA, reação de PCR utilizando primers de identificação e eletroforese

De cada colônia previamente isolada, foi realizada cultura por 24h e em seguida o DNA foi extraído utilizando o Qiaamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir: 1. Adicionar 500 µl de solução AE (Elution Buffer) em cada microtubo contendo as amostras de *E. faecalis*, 2.

Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos, 3. Remover o sobrenadante, 4. Adicionar 180µl de ATL (Tissue Lysis Buffer) e 20µL de proteinase K, 5. Incubar a 56°C por 30 minutos, 6. Adicionar 200µL de AL (Lysis Buffer) e novamente incubar a 70°C por 10 minutos, 7. Adicionar 200µL de etanol 100% e transferir todo volume para tubos com filtro (QL Amp Mini Spin Collum), 8. Centrifugar os tubos a 8000 rpm por 1 minuto, 9. Transferir o filtro para outro tubo vazio do kit, 10. Adicionar 500µl de AW1 (Wash Buffer 1), 11. Novamente centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, 12. Realizar o mesmo processo para a adição de 500µl de AW2 (Wash Buffet 2), 13. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos, 14. Transferir os filtros para eppendorfs de 1,5 mL com tampa, 15. Adicionar 100µL de solução AE (Elution Buffer), 16. Aguardar 3 minutos para nova centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto e 17. A solução com o DNA das amostras foi conservada em freezer - 20°C para posterior processamento.

4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Alíquotas de 1,5 µL do DNA extraído (aproximadamente 75 ng) das amostras com as cepas já isoladas foram amplificadas utilizando um par de primers específicos para *Enterococcus faecalis* (5´ CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G 3´ e 5´CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC3´, 138pb). As reações de PCR utilizadas nesse estudo foram adaptadas de Sedgley et al. (2005). Essas reações foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo: 0,25 µL de cada primer (100µM), 2,5 µL da solução tampão (10X Taq buffer, Invitrogen, Brasil), 2 mM de (1,25µL) de MgCl₂, 0,2 mM (0,5µL) de cada dNTPs (Invitrogen), 0,125µL (DNA polymerase platinum taq (5 U/µL, Invitrogen), 18,6 µL de água Mili-Q.

Foi utilizado um aparelho de termociclagem Biocycler (Biometra, Gottingen, Alemanha) para a amplificação do DNA, seguindo os protocolos de temperatura descritos abaixo, de acordo com o artigo de Sedgley et al. (2005): 95°C por 2 minutos (temperatura inicial de desnaturação), 36 ciclos: 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos (extensão final)

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1,5%, corados com EZ-Vision DNA Dye (Amresco, Solon, OH, USA)

adicionados diretamente no gel, e visualizados sob luz ultravioleta (UV). As reações foram consideradas positivas na presença de bandas de tamanho molecular apropriado.

4.3 Investigação dos fatores de virulência de *Enterococcus faecalis* através de técnicas moleculares

Após a seleção por PCR, apenas as amostras positivas para a espécie de *E. faecalis* foram utilizadas para o estudo dos determinantes virulentos. Desta maneira, foram estudadas 25 cepas de *E. faecalis* isoladas.

4.3.1 Extração do DNA, reação de PCR utilizando primers dos genes de virulência e eletroforese

O DNA das cepas de *E. faecalis* confirmadas, extraídos na etapa 3.1.1 desse estudo, foram novamente utilizadas para a identificação dos genes de virulência. Os genes de virulência pesquisados foram: *gelE* (produção de gelatinase), *esp* (proteína de superfície), *ace* (adesina de ligação ao colágeno), *cylA* (ativador da citolisina) e *efaA* (antígeno A de *E. faecalis*).

Foram utilizadas alíquotas de 1,5 µL do DNA extraído (aproximadamente 75 ng) de cada amostra clínica. Essas reações foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo: 0,25 µL de cada primer (100µM), 2,5 µL da solução tampão (10X Taq buffer, Invitrogen, Brasil), 2 mM de (1,25µL) de MgCl₂, 0,2 mM (0,5µL) de cada NTPs (Invitrogen), 0,125µL DNA polymerase platinum taq (5 U/µl, Invitrogen), 18,6 µl água Mili-Q.

Os primers específicos e o comprimento do fragmento amplificado dos genes relacionado aos fatores de virulência (número de bases pares – bp) estão citados na Tabela 1. *E.faecalis* JH2-2 e MMH594 foram utilizados como controles positivos.

Tabela 1 - Pares de primers utilizados nas reações de PCR para detecção de genes de virulência em cepas de *E. faecalis* previamente isoladas.

Genes	Pares de primers (5'-3')	Comprimento do fragmento amplificado em pares de base (pb)
gelE	ACCCCGTATCATTGGTTT	405
	ACGCATTGCTTTTCCATC	
esp	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	932
	GCGTCAACACTTGCATTGCCGA	
ace	GGAATGACCGAGAACGATGGC	616
	GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG	
cylA	GACTCGGGGATTGATAGGC	688
	GCTGCTAAAGCTGCGCTTAC	
efaA	GCCAATTGGGACAGACCCTC	688
	CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	

Fonte: Sedgley et al. (2005)

Foi utilizado um aparelho de termociclagem Biocycler (Biometra, Gottingen, Alemanha) para a amplificação do DNA, seguindo o protocolo de temperatura descrito por Sedgley et al. (2005), a seguir: 95 °C por 2 minutos (temperatura inicial de desnaturação), 35 ciclos: 94 °C por 20s, 58 °C por 45s (anelamento), 72 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos (extensão final)

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1,5% corados com EZ-Vision DNA Dye (Amresco, Solon, OH, USA) adicionados diretamente no gel, e visualizados sob luz ultravioleta (UV). As reações foram consideradas positivas na presença de bandas de tamanho molecular apropriado. Foram utilizados marcadores moleculares de 100 pb (pares de base) ou 1 kb (kilobase).

4.4 Análise estatística

Os dados coletados foram introduzidos numa planilha de cálculo e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA). A estatística descritiva foi aplicada e a frequência absoluta e a relativa foram calculadas.

5 RESULTADOS

Por meio da técnica molecular de PCR, 25 cepas previamente isoladas (Figura 1) foram confirmadas como sendo da espécie *Enterococcus faecalis*.



Figura 1 – *E. faecalis* isolado de casos de insucesso do tratamento endodôntico e plaqueado em meio de cultura.

Os genes de virulência *efaA* e *cylA* dos isolados de *E. faecalis* foram detectados em 100% (25/25) das cepas, enquanto o *gelE* estava presente em 84% (21/25), o *ace* em 68% (17/25) e o *esp* em 56% (14/25). Os resultados encontrados estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Prevalência de genes de virulência de *E. faecalis* relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico pela técnica de PCR.

Cepas	ace	esp	gelE	efaA	cylA
1	-	-	-	+	+
2	-	-	+	+	+
3	+	-	+	+	+
4	+	-	+	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+
12	-	-	-	+	+
13	-	+	-	+	+
14	+	-	+	+	+
15	+	-	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	-	-	-	+	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+
21	+	-	+	+	+
22	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+
25	-	+	+	+	+

6 DISCUSSÃO

O insucesso do tratamento endodôntico pode ser causado por falhas nas etapas do tratamento, tanto na instrumentação quanto na utilização não eficiente de substâncias irrigadoras auxiliares para a desinfecção dos canais radiculares. Além disso, a falha no selamento coronário proporciona a penetração de microrganismos via microinfiltração desses canais. Entre outros fatores etiológicos com uma anatomia radicular complexa (Siqueira, et al., 2014).

No insucesso endodôntico, predominam bactérias Gram positivas, sendo *Enterococcus faecalis* frequentemente associado à infecção secundária/persistente. Além da alta prevalência de *Enterococcus faecalis* no insucesso, a presença de genes de virulência nessa bactéria reforça a importância de seu estudo, dado o potencial desses fatores patogênicos em causar injúrias ao hospedeiro (Barbosa-Ribeiro, et al., 2016).

Alguns genes de virulência estão relacionados com a colonização de microrganismos e outros com as lesões periapicais no hospedeiro. O *gelE* é um exemplo, este gene de virulência produtor de gelatinase, é responsável por causar reabsorção óssea quando encontrado em canais com insucesso endodôntico. Kayaoglu et al. (2004) constataram, em uma revisão de literatura, que a inibição da gelatinase causa uma diminuição do processo de reabsorção óssea. Neste trabalho o *gelE*, esteve presente em 84% das cepas estudadas, concordando com a alta prevalência do gene encontrada por Zhu et al. (2010) e Barbosa-Ribeiro et al. (2016b).

O *esp*, outro gene de virulência presente em *E. faecalis*, é uma proteína de superfície responsável por facilitar a adesão de biofilme nas paredes dos canais radiculares. Foi encontrado em 56% das espécies testadas. Adicionalmente, o *ace*, encontrado em 68% das amostras, é uma adesina de ligação ao colágeno, responsável também pela adesão de biofilme nas paredes dos canais radiculares. Esta característica de formação de biofilme causada pela expressão dos genes *esp* e *ace*, pode ser observada no artigo de Shujun Ran et al. (2013). Ademais, prevalências similares a dessa pesquisa (*ace* 64,3% e *esp* 44,3%) foram encontradas por Strateva e colaboradores em 2016.

Já o *efaA*, presente em todas as cepas pesquisadas, tem sido relacionado como antígeno da endocardite bacteriana, representando um sério risco a saúde do paciente, caso não retirado dos canais radiculares durante o tratamento endodôntico. Afirmando a relevância do estudo desse gene do *E. faecalis*, um trabalho anterior demonstrou que o *efaA* pode funcionar como uma adesina na endocardite (Lowe et al., 1995). Altas prevalências desse gene também foram detectadas por Sedgley (2005) e Barbosa-Ribeiro et al. (2016b).

Medeiros et al. (2014), comparando genotipicamente cepas clínicas e de alimentos de *E. faecalis*, encontraram que nas cepas clínicas as maiores prevalências são dos genes, proteína de superfície enterocócica (*esp*) e citolisina (*cylA*) em comparação com os genes isolados de alimentos. O gene *esp* só foi encontrado em cepas clínicas. Entretanto, a gelatinase (*gelE*) e genes fator de aderência (*ace*) foram semelhantes em sua prevalência entre as cepas.

Em nosso trabalho pudemos observar que os genes de virulência estudados como o *gelE*, *esp*, *ace*, *cylA* e *efaA* estiveram presentes em grande porcentagem das cepas de *E. faecalis* isoladas. Mais estudos são necessários para correlacionar a presença desses fatores de virulência com a capacidade de cada cepa em expressar o potencial patogênico previamente verificado geneticamente.

7 CONCLUSÃO

Até o momento foi possível concluir que as cepas apresentam diferentes padrões de detecção dos genes de virulência, estando cada um deles presente em pelo menos metade dos isolados, o que revela a importância desta bactéria na patogênese e persistência da infecção endodôntica pós-tratamento.

REFERÊNCIAS*

- Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. J Endod. 2011 Feb;37(2):191-6.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. J Endod. 2016b Jul;42(7):1022-8.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. J Endod. 2016 Apr;42(4):552-6.
- Castilho AL, Saraceni CH, Díaz IE, Paciencia ML, Suffredini IB. New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. Braz Oral Res. 2013 Mar-Apr;27(2):109-15.
- Delboni MG, Gomes BP, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Endod. 2017 Mar;43(3):377-82.
- Francisco PA. Detecção de micro-organismos e de seus fatores de virulência na saliva, câmara pulpar e canal radicular de dentes associados ao insucesso endodôntico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - 2017.

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

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996 Mar; 29 (2):69–75.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2008 May;34(5):537-40.

Hong BY, Lee TK, Lim SM, Chang SW, Park J, Han SH, et al. Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. *J Endod*. 2013 Sep;39(9):1136-40.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Sep 1;15(5):308-20.

Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human β -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod*. 2012 Mar;38(3):351-6.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig*. 2014 Dec;18(9):2095-102.

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014 Apr 18;45(1):327-32.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6):348-81.

Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. *Braz Oral Res*. 2016 Oct 10;30(1):e103.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan AS. Detection of *Treponema denticola* in symptomatic apical periodontitis and in symptomatic apical abscesses by real-time PCR. Eur J Dent. 2009a Apr;3(2):107-13.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. J Appl Oral Sci. 2009 Sep-Oct;17(5):370-4.

Qian WH, Hong J, Xu PC. Análise das possíveis causas da endodontia falha do tratamento por inspeção durante o tratamento microcirúrgico apical. Xangai Kou Qiang Yi Xue. 2015 abr; 24 (2): 206-9. Chinês.

Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. J Endod. 2008 Aug;34(8):926-31.

Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. J Endod. 2004 Jul;30(7):504-8.

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. Oral Microbiol Immunol. 2005 Feb;20(1):10-9.

Shankar N, Lockatell CV, 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 Jul;69(7):4366-72.

Ran S, He Z, Liang J. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: Changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts, Elsevier.2013.08.013.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. Br Dent J. 2014 Mar;216(6):305-12.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*. 2007;18(4):267-80.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3.

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

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):950-7.

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

Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: *Essential endodontology*. Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. Oxford: Blackwell. 1998: 242-77.

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent*. 2016 Jan-Mar;10(1):144-7.

Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis*. 2016 Mar-Apr;20(2):127-33.

Top J, Paganelli FL, Zhang X, van Schaik W, Leavis HL, van Luit-Asbroek M, et al. The *Enterococcus faecium* enterococcal biofilm regulator, EbrB, regulates the esp operon and is implicated in biofilm formation and intestinal colonization. *PLoS One*. 2013 May 31;8(5):e65224.

Tzanetakis GN, Azcarate-Peril MA, Zachaki S, Panopoulos P, Kontakiotis EG, Madianos PN, et al. Comparison of bacterial community composition of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing. *J Endod*. 2015;41(8):1226-33.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. J Endod. 2006 Aug;32(8):715-21.

Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. J Endod. 2010 Dec;36(12):1950-5.

ANEXOS

Anexo 1 –Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio

PEDRO IVO 23-9-18			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
17% ÍNDICE DE SEMELHANÇA	16% FONTES DA INTERNET	13% PUBLICAÇÕES	10% DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1 repositorio.unesp.br Fonte da Internet	6%		
2 pct.capes.gov.br Fonte da Internet	2%		
3 clonerresources.com Fonte da Internet	1%		
4 www.repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	1%		
5 pure.amc.nl Fonte da Internet	1%		
6 jmm.microbiologyresearch.org Fonte da Internet	1%		
7 dspace.ucuenca.edu.ec Fonte da Internet	1%		
8 tede2.uepg.br Fonte da Internet	1%		
9 dialnet.unirioja.es Fonte da Internet	1%		
10 www.ibpm.ru Fonte da Internet	1%		
11 Shahram Shahraki, Morteza Rabi Nezhad Mousavi. "Determination of Virulence Factors in Clinical Multidrug Resistance Enterococci Isolates at Southeast of Iran", Jundishapur Journal of Microbiology, 2017 Publicação	1%		
12 www.revistas.usp.br Fonte da Internet	1%		
13 www.scielo.br Fonte da Internet	1%		
14 profiles.ouhsc.edu Fonte da Internet	1%		
15 portais4.ufes.br Fonte da Internet	1%		
16 Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	1%		
Excluir citações Excluir bibliografia	Desligado Desligado	Excluir correspondências	< 1%

Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Investigação microbiológica e de seus fatores de virulência nas diferentes patologias pulpaes e periradiculares e sua interação com o sistema imunológico inato"**, CAAE 48374615.7.0000.5418, dos pesquisadores **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Priscila Amanda Francisco, Augusto Rodrigues Lima, Pedro Ivo da Graça Fagundes, João Carlos Leme Junior, Eloá Cristina Bicego Pereira e Rafaela Casadei Chapola**, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em 21/10/2015 (projeto original), em 30/01/2018 (primeira emenda) e em 07/05/2018 (segunda emenda).

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project **"Microbiological and virulence factors investigation in different pulp and periradicular pathologies and their interaction with innate immune system"**, CAAE 48374615.7.0000.5418, of the researcher's **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Priscila Amanda Francisco, Augusto Rodrigues Lima, Pedro Ivo da Graça Fagundes, João Carlos Leme Junior, Eloá Cristina Bicego Pereira and Rafaela Casadei Chapola**, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on 10/21/2015 (original project), on 01/30/2018 (first amendment) and on 05/07/2018 (second amendment).

Prof. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 3 – Iniciação Científica

De: sage@fapesp.br <sage@fapesp.br>

Enviado: sexta-feira, 24 de agosto de 2018 18:01:03

Para: pedrinhofagundes9@hotmail.com

Assunto: [FAPESP] - Divulgação de Resultado de Despacho

Prezado(a) Senhor(a):

Ref.: 2018/00587-5

Objeto(s) de análise: Relatório Científico 1

Nome do Responsável: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Nome do Beneficiário: Pedro Ivo da Graça Fagundes

Vínculo Institucional: Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

Linha de Fomento: Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo

Coordenação de Área: Saúde II

Prezado(a) Sr(a),

Comunicamos que o Relatório Científico de Progresso da bolsa em questão foi preliminarmente analisado pela Coordenação de Área da FAPESP. O Relatório Científico de Progresso será encaminhado juntamente com o Relatório Científico Final para análise e emissão do parecer da assessoria, conforme normas para Relatório Científico de Iniciação Científica disponível em <http://www.fapesp.br/248#258>

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico - FAPESP