



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**JOÃO CARLOS LEME JUNIOR**

**ANÁLISE DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E DOS  
FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *ENTEROCOCCUS*  
*FAECALIS* ISOLADAS DE DENTES ASSOCIADOS AO  
INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO**

PIRACICABA

2019

**JOÃO CARLOS LEME JUNIOR**

**ANÁLISE DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E DOS  
FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *ENTEROCOCCUS  
FAECALIS* ISOLADAS 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.

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

Co-orientador: Priscila Amanda Francisco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO  
FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE  
CURSO APRESENTADO PELO ALUNO JOÃO  
CARLOS LEME JUNIOR E ORIENTADO PELA  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE  
ALMEIDA GOMES

PIRACICABA  
2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2017/26973-6

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

L542a Leme Junior, João Carlos, 1993-  
Análise da capacidade de formação de biofilme e dos fatores de virulência de cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de dentes associados ao insucesso do tratamento endodôntico / João Carlos Leme Junior. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

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. Biofilme. 4. Gelatinases. 5. Beta-Lactamases. 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

Biofilms

Gelatinases

Beta-Lactamases

**Titulação:** Cirurgião-Dentista

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 02-05-2019

## **DEDICATÓRIA**

À minha família, por acreditarem no meu potencial e investirem em mim. E também aos meus verdadeiros amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas e com isso fizeram os meus anos na graduação serem menos pesados.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de iniciação científica no país, processo nº 2017/26973-6.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, com sua paixão pela endodontia e por amar em ensinar, me orientou com paciência e atenção.

À minha Co-Orientadora Priscila Amanda Francisco, sempre com um sorriso no rosto e paciência me orientava fazendo o medo de dar errado ia embora. E realmente dava tudo certo.

À minha família que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis e lutaram para que eu conseguisse chegar até o fim.

Aos meus amigos que conheci na faculdade Daniel Kawakami, Leonard Fujita, Felipe Pego, João Pedro Sossai e Henrique Tonelli que sempre estiveram comigo nos bons e maus momentos nessa jornada na FOP.

Aos meus amigos, Carlos Dornelles e Gérson Nascimento, em que nesses últimos meses o fortalecimento da nossa amizade foi como um combustível para aguentar a ansiedade e os obstáculos do final do curso.

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

## RESUMO

A causa da doença endodôntica pós-tratamento é essencialmente uma infecção bacteriana. *Enterococcus faecalis* é uma bactéria frequentemente isolada de canais radiculares em casos de falha do tratamento endodôntico, sendo esta capaz de aderir as paredes dos canais radiculares, a gutta-percha ou a cimentos endodônticos, permitindo a formação de um biofilme resistente. Além disso esse microrganismo possui fatores de virulência que podem ser importantes no desenvolvimento da patologia endodôntica e na resistência do *E. faecalis* à antibióticos. Os objetivos do presente projeto foram: a) avaliar a capacidade de formação de biofilme de cepas de *E. faecalis* isoladas de casos de insucesso do tratamento endodôntico; b) verificar a atividade da gelatinase e  $\beta$ -lactamase dessas mesmas cepas. Foram utilizadas 25 cepas de *Enterococcus faecalis* previamente coletadas e isoladas pelo método de cultura, estas foram também confirmadas através do método molecular PCR, utilizando primers de *E. faecalis*. A formação de biofilme foi realizada em microplacas de poliestireno pelo método de coloração com cristal de violeta. Para a verificação da atividade da gelatinase um inóculo de uma cultura pura, das cepas previamente isoladas, foi depositado em tubos contendo gelatina e um caldo nutriente. Já para a verificação da ação da  $\beta$ -lactamase, foram utilizadas tiras de  $\beta$ -lactamase (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Os resultados indicaram que 4 amostras não apresentaram formação de biofilme, 17 cepas tiveram fraca formação e 4 apresentaram moderada formação. A produção de gelatinase foi observada em 3 cepas e a resistência à  $\beta$ -lactamase em 5 cepas de *E. faecalis*. Nenhum dos dois fatores de virulência foi encontrado simultaneamente na mesma cepa. Concluiu-se que houve o predomínio de cepas com capacidade de formação de biofilme, substrato importante na manutenção da infecção endodôntica. Além disso, verificou-se que algumas cepas de *E. faecalis* são capazes de hidrolisar gelatina, colágeno e outras proteínas e podem influenciar a reabsorção óssea periapical na lesão perirradicular apical pós-tratamento. Por fim, a resistência à  $\beta$ -lactamase foi detectada em alguns isolados clínicos, reforçando a atenção para o desenvolvimento de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos.

**Palavras-Chave:** Endodontia. Microbiologia. Biofilme. PCR.  $\beta$ -lactamases. Gelatinases.

## ABSTRACT

The cause of post-treatment endodontic disease is essentially a bacterial infection. *Enterococcus faecalis* is a bacterium frequently isolated from root canals in cases of failure of endodontic treatment, being able to adhere the root canal walls, gutta-percha or endodontic cements, allowing the formation of a resistant biofilm. In addition, this microorganism has virulence factors that may be important in the development of endodontic pathology and resistance of *E. faecalis* to antibiotics. The objectives of this project were: a) to evaluate the biofilm formation capacity of strains of *E. faecalis* isolated from cases of failure of endodontic treatment; b) to verify the activity of the gelatinase and  $\beta$ -lactamase of these same strains. Twenty-five strains of *Enterococcus faecalis*, previously collected and isolated by the culture method, were also confirmed by PCR using *E. faecalis* primers. Biofilm formation was performed on polystyrene microplates by the violet crystal staining method. For the verification of gelatinase activity an inoculum of a pure culture of the previously isolated strains was deposited in tubes containing gelatin and a nutrient broth. For  $\beta$ -lactamase action,  $\beta$ -lactamase strips (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) were used. The results indicated that 4 samples did not present biofilm formation, 17 strains had poor formation and 4 had moderate formation. Gelatinase production was observed in 3 strains and  $\beta$ -lactamase resistance in 5 strains of *E. faecalis*. Neither virulence factor was found simultaneously in the same strain. It was concluded that there was a predominance of strains with capacity for biofilm formation, an important substrate in the maintenance of endodontic infection. In addition, some strains of *E. faecalis* have been found to be capable of hydrolyzing gelatin, collagen and other proteins and may influence periapical bone resorption in the post-treatment apical periradicular lesion. Finally, resistance to  $\beta$ -lactamase was detected in some clinical isolates, reinforcing attention to the development of bacterial resistance to antimicrobial agents.

**Keywords:** Endodontics. Microbiology. Biofilms. PCR.  $\beta$ -lactamases. Gelatinases.

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO                                                                                              | 9  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA                                                                                   | 12 |
| 2.1 Infecção endodôntica e o insucesso do tratamento endodôntico                                          | 12 |
| 2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>                                                                        | 12 |
| 2.1.2 Fatores de virulência                                                                               | 13 |
| 3 PROPOSIÇÃO                                                                                              | 15 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS                                                                                      | 16 |
| 4.1 Autorização para a realização da pesquisa                                                             | 16 |
| 4.2 Confirmação de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados através de técnicas moleculares (n=20)           | 16 |
| 4.2.1 Extração do DNA, reação de PCR utilizando primers de identificação e eletroforese                   | 16 |
| 4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)                                                                | 17 |
| 4.3 Formação de biofilme                                                                                  | 18 |
| 4.4 Investigação dos fatores de virulência dos <i>Enterococcus faecalis</i> através de métodos de cultura | 19 |
| 4.4.1 Atividade da Gelatinase das cepas de <i>E. faecalis</i> isoladas                                    | 19 |
| 4.4.2 Ação da $\beta$ -Lactamase sobre as cepas de <i>E. faecalis</i> isoladas                            | 19 |
| 4.5 Análise estatística                                                                                   | 20 |
| 5 RESULTADOS                                                                                              | 21 |
| 6 DISCUSSÃO                                                                                               | 26 |
| 7 CONCLUSÃO                                                                                               | 29 |
| REFERÊNCIAS                                                                                               | 30 |
| ANEXOS                                                                                                    | 35 |
| Anexo 1 –Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio                                               | 35 |
| Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP                                                      | 36 |
| Anexo 3 –Iniciação Científica                                                                             | 37 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os principais objetivos do tratamento endodôntico são prevenir ou tratar os periodontites apicais para que o dente possa ser mantido na cavidade oral em condições saudáveis (Siqueira, 2011; Estrela et al., 2014). A ocorrência de sinais e/ou sintomas de doença em associação a dentes com canal radicular tratado significa que a periodontite apical está presente, ou seja, houve um insucesso no tratamento endodôntico anterior, que pode ter ocorrido por falha na prevenção e controle da infecção intrarradicular (Siqueira, 2011). No entanto, o insucesso pode também ser observado em alguns dentes aparentemente bem tratados, possivelmente por questões relacionadas a complexa anatomia do sistema de canais radiculares. Foi relatada a ocorrência de doença pós-tratamento em 5-15% dos dentes com periodontite apical pré-operatória, mesmo quando o tratamento seguiu padrões adequados (Sjögren et al., 1990).

A causa da doença endodôntica pós-tratamento é essencialmente uma infecção bacteriana. Esta pode ser uma infecção intrarradicular persistente ou secundária, mas em alguns casos pode ser uma infecção extrarradicular. Fatores não-microbianos também têm sido sugeridos como uma causa potencial da doença pós-tratamento, mas a evidência é relativamente fraca, pois provém de alguns relatos de casos (Nair, 2004).

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

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa frequentemente isolada de canais radiculares em casos de falha do tratamento endodôntico (Ozbek, 2009; Ribeiro-Barbosa et al., 2016; Delboni et al., 2017) e são capazes de aderir as paredes dos canais radiculares, a gutta-percha ou

a cimentos endodônticos, permitindo a formação de um biofilme resistente. (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013).

A reprodução em biofilmes é vantajosa para os microrganismos, pois formam comunidades tridimensionais com canais de transporte de fluidos, como substrato; resíduos e moléculas de sinalização (Usha et al., 2010). Essas comunidades estão ligadas a uma superfície e incorporadas em uma matriz de polissacarídeos e proteínas, formando uma camada viscosa (Portentier et al., 2003). O biofilme pode ser formado em regiões de difícil acesso para os procedimentos de limpeza realizados durante o tratamento endodôntico. Sua remoção ou máxima redução é primordial para a manutenção do dente em condições saudáveis na cavidade oral, e representa um desafio no tratamento dos canais radiculares. A falha no controle do biofilme é um fator determinante do insucesso endodôntico (Ricucci e Siqueira, 2010). Os biofilmes podem ser estudados *in vitro* utilizando-se modelos de formação em diversos substratos, como: placas de poliestireno; dentina humana; dentina bovina; e osso bovino. Para sua análise, técnicas colorimétricas e de microscopia, como a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia confocal, são amplamente utilizadas (Dugan et al., 2007; Kishen e Haapasalo, 2010).

As substâncias produzidas pelos microrganismos que podem causar dano ao hospedeiro, por exemplo: toxinas bacterianas e fatores de resistência a antibióticos, são referidas como fatores de virulência (Schaechter et al., 1999; Kayaoglu e Ørstavik, 2004). Um exemplo de fator de virulência é gelatinase que são peptidases extracelulares capazes de hidrolisar a gelatina, o colágeno e outras proteínas (peptídeos). Elas são produzidas por um grande número de *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados ou com endocardite (Thurlow et al., 2010). A resistência bacteriana às penicilinas é um problema de grande relevância clínica visto seu uso indiscriminado por muitos anos (Appelbaum et al. 1990). A resistência de *E. faecalis* tem sido ocasionalmente associada à produção de  $\beta$ -lactamase (Morrison et al., 1997; Pinheiro et al., 2004).

Dessa forma, compreendendo a importância da capacidade de formação do biofilme como agente etiológico das infecções endodônticas e a influência dos fatores de virulência na saúde do hospedeiro, é relevante analisar a formação de biofilme por cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas do insucesso endodôntico e

verificar a atividade de fatores de virulência como a gelatinase e a  $\beta$ -lactamase dessas mesmas cepas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecção endodôntica e o insucesso do tratamento endodôntico

Infecções endodônticas podem ser classificadas 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. De acordo com a maioria dos autores da literatura, as infecções primárias apresentam maior carga e diversidade bacteriana. 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 (Hong et al., 2013; Tzanetakis et al., 2015; Nóbrega et al., 2016).

De outro modo, as infecções secundárias, representam o insucesso do tratamento endodôntico anterior e mostram uma microbiota quantitativa e qualitativa diferente da primeira infecção. O insucesso 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 que pode ocasionar microinfiltração de microrganismos nos canais, considerados como fatores etiológicos. (Sundqvist e Figdor, 1998; Nair, 2004; Gomes et al., 2008; Siqueira et al., 2014; Tzanetakis et al., 2015).

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

#### 2.1.1 *Enterococcus Faecalis*

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa que habita no trato gastrointestinal de seres humanos e animais, estão

presentes no solo, a água, em plantas e em produtos alimentares (Medeiros et al., 2013). Entretanto, também é associada às infecções secundárias por isso é amplamente estudada em trabalhos sobre insucesso endodôntico. (Gomes et al., 1996, Siqueira et al., 2007, Ozbek, 2009, Ribeiro-Barbosa et al., 2016; Delboni et al., 2017)

### 2.1.2 Fatores de virulência

Fatores de virulência são substâncias sintetizadas por microrganismos, as quais podem causar danos ao hospedeiro, isto é, aumentar sua patogenicidade. Como exemplo dessas substâncias temos toxinas bacterianas, como a gelatinase, e fatores de resistência a antibióticos, como a  $\beta$ -lactamase. (Schaechter et al., 1999; Kayaoglu e Ørstavik, 2004).

*Enterococcus* estão entre os três primeiros patógenos bacterianos nosocomiais (Kayaoglu & Ørstavik, 2004), e cepas de *Enterococcus* resistentes aos antibióticos atualmente representam dificuldades terapêuticas (Hunt, 1998). Até 90% de infecções enterocócicas em humanos são causadas por *Enterococcus faecalis*. (Kayaoglu & Ørstavik, 2004).

A resistência de *E. faecalis* em infecções radiculares pode estar relacionado com sua capacidade de formar biofilmes em canais radiculares (Distel et al., 2002; Duggan et al., 2007). A reprodução em biofilmes é bem favorável para os microrganismos, pois formam colônias tridimensionais com canais de troca de fluidos, como substrato, resíduos, materiais genéticos e moléculas de sinalização (Usha et al., 2010). Essas colônias estão conectadas a uma superfície e incorporadas em uma matriz de polissacarídeos e proteínas, formando uma camada viscosa (Portentier et al., 2003).

A gelatinase é uma metaloprotease de zinco, codificada por *gelE*, com capacidade hidrolítica (Lindenstrau et al., 2011). Ela é capaz de hidrolisar hemoglobina, colágeno, caseína, insulina, fibrinogênio, gelatina e outras proteínas (Thurlow et al., 2010, Pillay et al. 2018,). Entretanto, segundo Marra et al. (2007), a presença de *gelE* não está necessariamente correlacionada com a atividade da

gelatinase. Alguns estudos sugerem que outros genes podem estar associados ao controle da expressão de gelE.

As  $\beta$ -lactamases são amplamente encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Todos eles inativam as penicilinas e as cefalosporinas, abrindo o anel  $\beta$ -lactâmico (Ambler, 1980). A resistência de *E. faecalis* tem sido casualmente associada à produção de  $\beta$ -lactamase (Morrison et al., 1997; Pinheiro et al., 2004), entretanto, há poucos trabalhos na literatura que investigaram essa resistência.

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

### 3 PROPOSIÇÃO

Diante disto, os objetivos do estudo foram:

- a) Avaliar a capacidade de formação de biofilme de cepas de *E. faecalis* isoladas de casos de insucesso do tratamento endodôntico;
- b) Verificar a atividade da gelatinase e  $\beta$ -lactamase dessas mesmas cepas.

## 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 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% CO<sub>2</sub>, 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

Protocolo aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) sob número: 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 da 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 transferiu-se 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 Buffer 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 e será 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 que foram 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 MgCl<sub>2</sub>, 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.

Utilizado-se 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: 94°C por 30s, 45°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 2 minutos, 72°C por 10 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 Formação de biofilme**

A formação de biofilme foi realizada em microplacas de poliestireno pelo método de coloração com cristal de violeta com algumas modificações (Medeiros et al., 2013, Dugan et al., 2007 e Demo et al., 1996).

As cepas foram cultivadas a 37 ° C em caldo de soja trípico (TSB, meio Bacto Tryptic Soy Broth, contém 0,25% de glucose, Becton, Dickinson e Co) durante 18 h. As culturas foram diluídas 1: 100 em meio de TSB e 200 µL desta suspensão bacteriana foi depositada em placas de poliestireno (Falcon, Becton, Dickinson e Co, Franklin Lakes, NJ) de 96 poços de fundo plano esterilizadas. O protocolo foi realizado em triplicata para cada cepa. Para os controles negativos, TSB puro foi distribuído em 3 poços por placa. Em seguida, foi procedido um período de incubação a 37 ° C durante 24 horas.

O caldo foi, então, cuidadosamente retirado da placa utilizando-se uma pipeta multicanal. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de solução salina tamponada com fostato. Os biofilmes foram fixados com 200 µL do fixador Bouin (Ricca Chemical Company, Arlington, TX) durante 30 minutos e lavados com água destilada.

Posteriormente, os biofilmes foram corados com 200 µL de solução de cristal violeta a 1% por 30 minutos e os poços foram lavados com água destilada. As placas foram invertidas numa toalha de papel e secas ao ar. Para quantificar a produção de biofilme, serão adicionados 200 µL de etanol-acetona (80:20, vol / vol).

Para a leitura, a densidade óptica do cristal violeta resolubilizado foi medida à 570 nm (OD<sub>570</sub>) utilizando um leitor de placas de microtitulação (Bio-Tek ELx800, Winooski, VT). Os poços contendo TSB puro serviram como controle negativo e para determinar a densidade ótica do branco. A leitura da densidade ótica de cada cepa foi realizada através da média da triplicata subtraída das leituras médias de OD<sub>570</sub> do

branco, como descrito anteriormente por Demo et al. (1996). *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) foi utilizado com controle.

#### **4.4 Investigação dos fatores de virulência dos *Enterococcus faecalis* através de métodos de cultura**

##### **4.4.1 Atividade da Gelatinase das cepas de *E. faecalis* isoladas**

Um inóculo de uma cultura pura das cepas previamente isoladas, foi depositado em tubos contendo 12% de gelatina em 0,8% de caldo nutriente (Difco Labs, Detroit, MI). Os tubos foram incubados durante 72 horas à 24°C.

Posteriormente foram colocados em um refrigerador durante aproximadamente 30 min. Se a gelatina ainda estivesse intacta o resultado era considerado negativo, ou seja, as bactérias não produziram gelatinase e o meio solidificou em temperatura baixa. Quando ocorreu a produção de gelatinase, o tubo permaneceu líquido no refrigerador, e o resultado foi considerado positivo. Protocolo de acordo com Marra et al. (2007).

##### **4.4.2 Ação da $\beta$ -Lactamase sobre as cepas de *E. faecalis* isoladas**

Foram utilizadas tiras de  $\beta$ -lactamase (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) para a detecção acidimétrica rápida da atividade de  $\beta$ -lactamase de microrganismos. O teste baseia-se na hidrólise do anel p-lactama na benzilpenicilina, que resulta na produção de ácido penicilóico. Este processo provoca a acidificação da bactéria em suspensão, e altera a cor do indicador acido-básico.

A cepa a ser estudada foi plaqueada em uma placa de Petri. Depois de 24 horas as colônias estavam formadas e a tira do teste da  $\beta$ -lactamase foi passada sobre as colônias da placa. O teste exige que a placa esteja úmida, para isso foi utilizado 10  $\mu$ L de água destilada dispensada sobre o meio de cultura.

A tira foi incubada a temperatura ambiente por 2-10 minutos. Os resultados foram interpretados da seguinte forma:

- Reação negativa: nenhuma mudança de cor se desenvolve na posição onde se passou a tira pela colônia.
- Reação positiva: uma mancha roxa se desenvolve na posição onde se passou a tira pela colônia.

#### **4.5 Análise estatística**

Os dados coletados foram introduzidos numa planilha de cálculo e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA).

## 5 RESULTADOS

Foi realizado inicialmente o isolamento das cepas de *E. faecalis* em meio de cultura específico e a confirmação das cepas de *E. faecalis* pelo método de reação de cadeia de polimerase. Em seguida foram realizados os métodos propostos, a seguir.

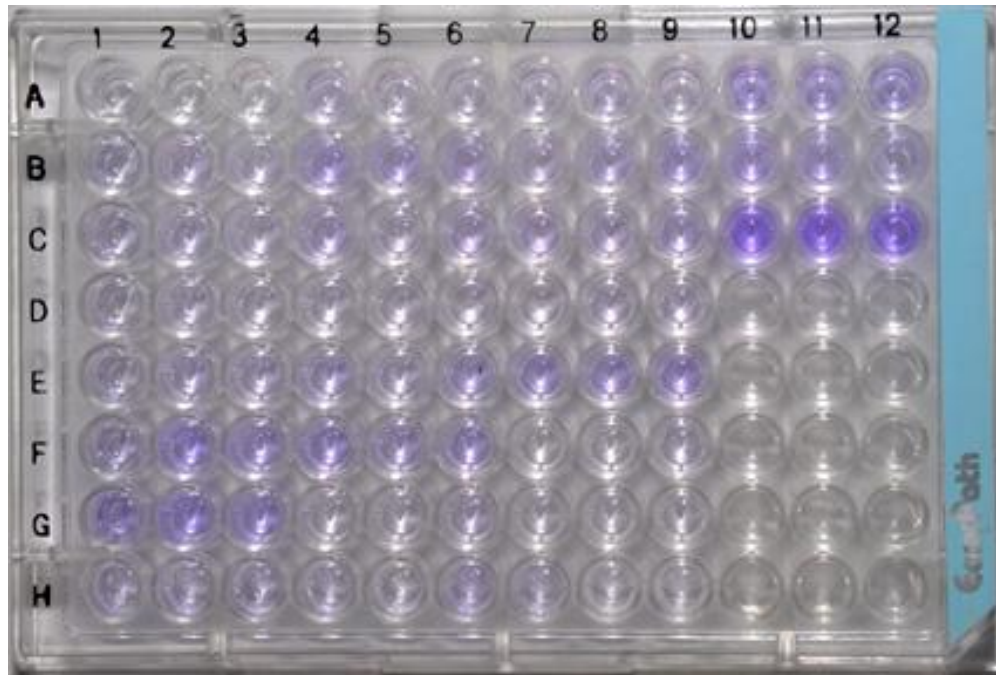


Figura 1 - Placa de microtitulação representativa com biofilmes de *E. faecalis* de 24 horas após a re-solubilização de cristal violeta usada para coloração de biofilmes. Uma coloração mais intensa representa uma formação de biofilme mais forte. Os poços A1, A2 e A3 representam o controle negativo e os poços C10, C11 e C12 o controle positivo para formação de biofilme.

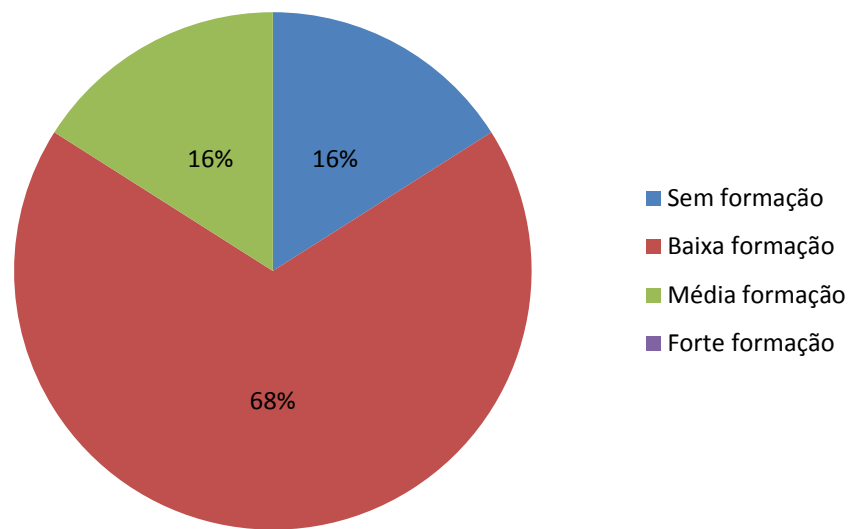


Figura 2 - Capacidade de formação de biofilme de acordo com Demo et al. (1996).

A capacidade de formação de biofilme das cepas analisadas está apresentada nas Figuras 1 e 2. Um total de 4 amostras não apresentaram formação de biofilme, 17 cepas tiveram fraca formação e 4 apresentaram moderada formação. O intervalo de leitura foi de  $DO_{570}$  0,003 – 0,153, com média de  $DO_{570}$  0,04832.

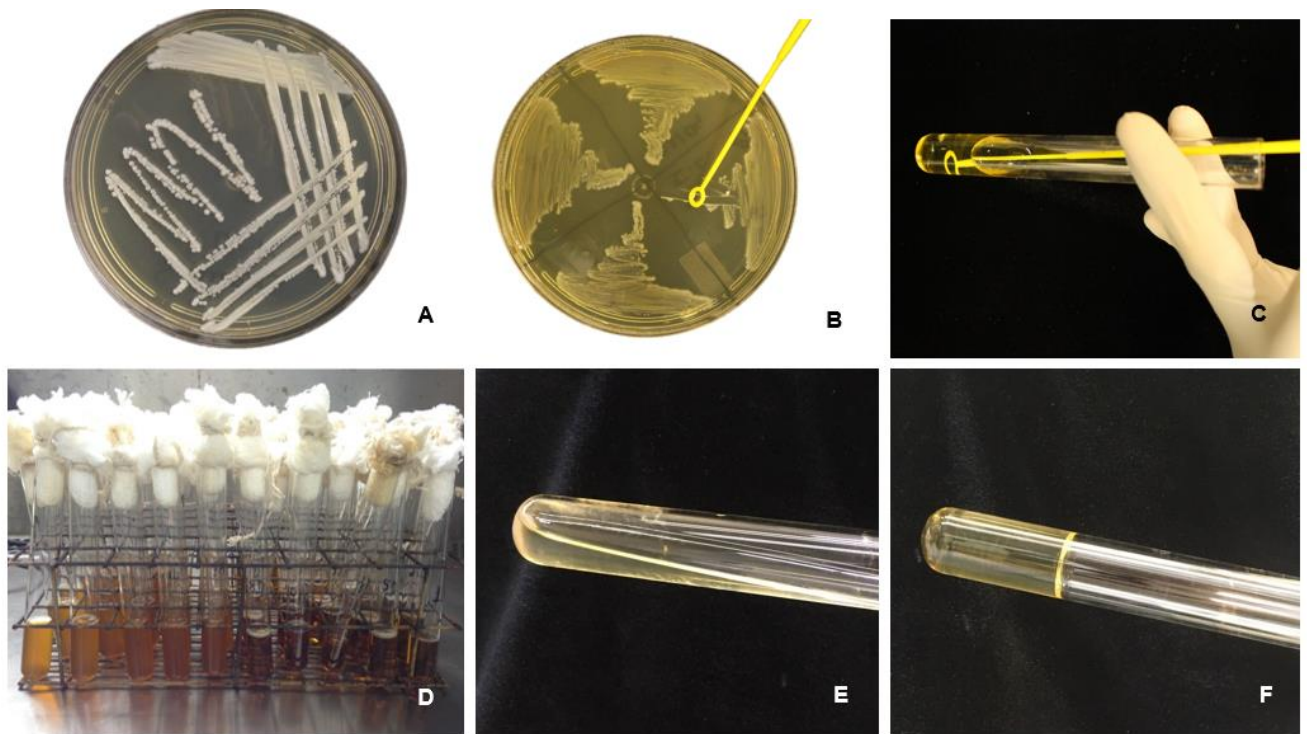


Figura 3 - Procedimentos para a verificação da atividade da gelatinase: A - Bactéria isolada; B - Remoção de uma porção da cepa previamente isolada e replicada; C - Aplicação do inóculo em tubos contendo 12% de gelatina em 0,8% de caldo nutriente (Difco labs, Detroit, MI); D - Tubos de ensaio incubados durante 72 horas à 24°C; E - Controle positivo (ágar liquefeito); F - Controle negativo (ágar solidificado).



Figura 4 - Procedimentos para a verificação da atividade da  $\beta$ -lactamase: A - Bactéria isolada; B - Disco de Nitrocefina ( $\beta$ -lactamase) utilizado no experimento; C - Cepas a serem estudadas plaqueadas em uma placa de Petri. Depois de 24 horas o disco do teste da  $\beta$ -lactamase foi posicionado sobre as colônias da placa previamente umedecidas; D - Reação positiva e negativa do teste.

A atividade de gelatinase e de  $\beta$ -lactamase das cepas analisadas estão apresentadas na Tabela 1. Um total de 3 amostras apresentaram atividade de gelatinase e 5 de  $\beta$ -lactamase. Entretanto nenhuma delas apresentaram as duas atividades concomitantemente.

Tabela 1 - Distribuição da atividade da gelatinase e da  $\beta$ -lactamase nas 25 cepas isoladas do insucesso endodôntico.

| Cepas | Atividade  |                    |
|-------|------------|--------------------|
|       | Gelatinase | $\beta$ -lactamase |
| 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

A microbiota encontrada nos canais de dentes com insucesso endodôntico deve-se a um processo de seleção dependente da resistência específica de determinados microrganismos ao preparo químico-mecânico (PQM) e à medicação intracanal. Além disso, deve-se à capacidade dessas espécies de sobreviver em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas, e ainda à resistência aos medicamentos utilizados para combatê-los. Esse mecanismo de resistência é resultante de alterações fisiológicas ou estruturais da célula bacteriana. (Di-Santi et al., 2015).

*E. faecalis* é uma bactéria anaeróbica facultativa Gram-positiva, comumente selecionada para ser estudada, visto que é frequente encontrada nos canais radiculares de casos tratados com falha endodôntica. (Dunavant et al., 2005; Duggan et al., 2007). Encontra-se na literatura que podem sobreviver como uma monoinfecção em canais radiculares (Pinheiro et al. 2003), além de apresentam resistência ao preparo químico-mecânico (Peciulienė et al., 2001) e medicação intracanal (Orstavik e Haapasalo 1990; Distel et al., 2002). A persistência de *E. faecalis* pode originar-se, em parte, de sua capacidade de formar biofilmes em canais radiculares (Distel et al., 2002; Duggan et al., 2007).

No presente estudo, a faixa de leituras de  $DO_{570}$  foi de -0,007 a 0,153. Os critérios usados para categorizar a capacidade de formação de biofilme em poços de poliestireno utilizado foi o mesmo em Demo et al. (1996) em que a intensidade de produção de biofilme foi escalonada sendo Fortes ( $DO_{570} > 0,3$ ; nenhum [0%]), médio ( $DO_{570}$ , 0,1 a 0,2; 4 isolados [16%]), ou fraco ( $DO_{570}$ , maior que 0 mas menor que 0,1; 17 isolados [68%]) formadores de biofilme ou como não formadores de biofilme ( $DO_{570} \leq 0$ ; 4 isolados [16%]). No total, 84% de cepas de *E. faecalis* apresentaram formação de biofilme. Estes resultados para canais radiculares e isolados orais corroboram com os de Duggan et al. (2007) quanto a frequência de formação de biofilme nas amostras estudadas, todavia, discordam quanto a faixa de leitura das densidades óticas, onde os autores verificaram uma maior produção de biofilme para cepas de origem endodôntica ( $DO_{570}$  0.012 a 1.801, média) que nesse presente estudo ( $DO_{570}$  0,003 – 0,153).

Apesar da alta prevalência de formadores de biofilme nesse estudo, as leituras de DO<sub>570</sub> foram mais baixas que em estudos anteriores que selecionaram cepas da endocardite (Mohamed et al., 2005), mas justificam sua importância dado o risco à saúde causado por essa patologia. Mohamed et al. (2005) relataram que 100% de suas 79 cepas de endocardite eram formadores de biofilme (9% fraco, 52% moderado e 39% forte) em comparação com 20% de 22 cepas de urina, 12% de 15 amostras fecais hospitalares e 15% de 16 amostras fecais comunitárias.

Estudos têm revelado um aumento significativo da resistência antimicrobiana das bactérias que são comumente encontradas nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica. A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser adquirida por uma mutação no DNA existente ou por aquisição de um novo gene por transferência horizontal as quais conferem resistência a várias classes de antibióticos, como a penicilina e cefalosporina. (Di-Santi et al., 2015; Thang et al., 2014).

Dentre microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos ao decorrer dos anos, destacam-se os *Enterococcus spp.* (Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Thang et al., 2014; Tavares, 2005). Os quais podem desenvolver atividade de beta-lactamase quebrando os anéis beta-lactâmicos dos antibióticos. Como consequência, torna as penicilinas bacteriostáticas e cefalosporinas praticamente ineficazes. Nesse trabalho 20% das cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas apresentaram atividade da  $\beta$ -lactamase, evidenciando a importância do rastreamento da resistência dessa espécie aos antibióticos. Em contrapartida, Di Sant et al. não encontraram resistência ao antibiótico beta-lactâmico em cepas de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares no insucesso endodôntico. Na literatura endodôntica, faltam trabalhos que monitorem a atividade da  $\beta$ -lactamase em cepas de *E. faecalis*.

É igualmente importante ressaltar um outro fator de virulência, a capacidade de *E. faecalis* sintetizar gelatinase que além de ser necessária para formação de biofilme (Di-rosa et al., 2006), desempenha um papel importante na reabsorção óssea (Hill et al., 1995). Três de 25 cepas (12%) de *E. faecalis* possuíam atividade da gelatinase neste trabalho, obtendo uma porcentagem menor do que encontrada na pesquisa de Medeiros e colaboradores (2013) (45,5%) que observaram

a produção de gelatinase da mesma espécie, porém em diferentes sítos, como amostras clínicas humanas (sangue, urina e secreção cervical) e em alimentos. E Di Rosa et al. (2006) (37%) que verificaram a produção da gelatinase de *E. faecalis* em amostras de meio-ambiente, flora intestinal, corpos estranhos, infecções urinárias, infecções cardiovasculares e outros. Em cepas de *E. faecalis* de canais radiculares da falha endodôntica, enquanto Sedgley et al. (2005) observaram a expressão da gelatinase em 70% (total de 31 cepas) dos isolados, Zhu et al. (2010) não detectaram alguma atividade da gelatinase (total de 13 cepas).

Em nosso trabalho pudemos observar que grande porcentagem das cepas de *E. faecalis* isoladas eram produtoras de biofilme, e que algumas dessas ainda apresentavam a produção de gelatinase, além de atividade da  $\beta$ -lactamase. Mais estudos são necessários para comparar os resultados encontrados tanto na infecção secundária/persistente, como na infecção primária. Ademais são necessárias pesquisas para correlacionar a presença desses fatores de virulência com a capacidade de cada cepa em expressar o potencial patogênico nos pacientes.

## 7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que houve o predomínio de cepas com capacidade de formação de biofilme, substrato importante na manutenção da infecção endodôntica. Além disso, verificou-se que algumas cepas de *E. faecalis* são capazes de hidrolisar gelatina, colágeno e outras proteínas e podem influenciar a reabsorção óssea periapical na lesão perirradicular apical pós-tratamento. Por fim, a resistência à  $\beta$ -lactamase foi detectada em alguns isolados clínicos, reforçando a atenção para o desenvolvimento de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS\*

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321-31.

Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR. Beta-lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* *Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Aug;34(8):1546-50.

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*. 2016 Jul;42(7):1022-8.

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):377-382.

Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, 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 Mar;256(1):145-50.

Di Santi BT, Barbosa-Ribeiro M, Endo MS, Gomes BPFA. Evaluation of antimicrobial susceptibility of facultative anaerobic bacteria isolated in root-filled teeth with persistent infection front to use of systemic antibiotics. *Rev Odontol UNESP*. 2015 Jul-Aug;44(4):200-6.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):689-93.

---

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

Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2007 Jul;33(7):815-8.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod. 2006 Jun;32(6):527-31.

Estrela C, Holland R, Estrela CR, Alencar AH, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. Braz Dent J. 2014 Jan-Feb;25(1):3-11.

Gao Y, Jiang X, Lin D, Chen Y, Tong Z. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. J Endod. 2016 Aug;42(8):1233-8.

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.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. J Endod. 2013 Mar;39(3):346-50.

Hill PA, Docherty AJ, Bottomley KM, O'Connell JP, Morphy JR, Reynolds JJ, et al. Inhibition of bone resorption in vitro by selective inhibitors of gelatinase and collagenase. Biochem J. 1995 May 15;308(Pt 1):167-75.

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.

Hunt CP. The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. Br J Biomed Sci. 1998 Jun;55(2):149-56.

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

Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics*. 2010;22:58-78.

Lindenstrauss AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Syst Appl Microbiol*. 2011 Dec;34(8):553-60.

Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, et al. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 May;58(1):59-65.

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.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3658-63. Erratum in: *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):7075.

Morrison D, Woodford N, Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1997;26:89S-99S.

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

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

Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan 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;17(5):370-4.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):429-34.

Pillay S, Zishiri OT, Adeleke MA. Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. Onderstepoort J Vet Res. 2018 Jun 27;85(1):e1-e8.

Pinheiro ET, Gomes BP, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2004 Nov;37(11):756-63.

Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*: The root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. Endod Topics 2003;6:135-59.

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

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.

Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. Mechanisms of microbial disease. 3th ed. Lippincott, Williams & Wilkins; 1999.

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.

Siqueira JF Jr. Treatment of endodontic infections. London: Quintessence; 2011.

Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment J Endod. 1990;16:498-504.

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

Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. Adv Drug Deliv Rev. 2014 Nov 30;78:3-13

Tavares W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. SBMT. 2000 mai-jun; 33(3):281-301.

Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 2010 Nov;78(11):4936-43.

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.

Usha HL, Kaiwar A, Mehta D. Biofilm in endodontics: New understanding to an old problem. Int J Contem Dent. 2010;1:44–51.

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



## 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 pulpares e perirradiculares 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).

**Profa. 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



sage@fapesp.br  
Seg. 25/02/2019 09:21  
Para: joaojunior\_@live.com

Prezado(a) Senhor(a):

Ref.: 2017/26973-6

Objeto(s) de análise: Relatório Científico 2  
Nome do Responsável: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes  
Nome do Beneficiário: João Carlos Leme Junior  
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

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.

Para visualizar o despacho, por favor, acesse o Sistema SAGE ([www.fapesp.br/sage](http://www.fapesp.br/sage)), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz  
Diretor Científico da FAPESP