



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ANA CAROLINA CHIPOLETTI DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA, VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE ÀS TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS DAS CEPAS DE *Enterococcus faecalis* E
Enterococcus faecium ISOLADAS DE INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS**

2014

ANA CAROLINA CHIPOLETTI DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA, VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE ÀS TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS DAS CEPAS DE *Enterococcus faecalis* E
Enterococcus faecium ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2014Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Santos, Ana Carolina Chipoletti dos
PREVALÊNCIA, VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE ÀS TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS DAS CEPAS DE Enterococcus faecalis E Enterococcus
faecium ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS / Ana Carolina Chipoletti
dos Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. Enterococcus faecalis. 2. Enterococcus faecium. 3.
Antimicrobianos. 4. Terapia fotodinâmica. 5. Galleria mellonella. I.
Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.
III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV.
UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 11 de Dezembro de 2014
E-mail: anacarolinachipoletti@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campos de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciência e Tecnologia Campos de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. José Chibebe Junior

FUNVIC – Fundação Vida Cristã
FAPI – Faculdade de Pindamonhangaba

São José dos Campos, 11 de Dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Telma Helena do Couto Chipoletti, pelo apoio e carinho. Sem ela eu não teria conseguido.

Ao meu marido, Leandro Prado Nunes da Silva, pela compreensão da minha ausência e pelo apoio.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida orientadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, obrigada por me aceitar como sua orientada, por acreditar na minha capacidade como pesquisadora. Por sua paciência, dedicação, amizade, por seu exemplo como pessoa e profissional. Com certeza todo crescimento foi pela sua excelente orientação.

Ao meu querido Prof. Dr. José Chibebe Junior, por ter sido meu maior incentivador em percorrer esse caminho, por acreditar na minha capacidade e me apoiar sempre, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pelos ensinamentos, pelo apoio em todos os momentos e por ser um excelente profissional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, pelo apoio constante para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Iniciação Científica concedida a aluna Jéssica Diane dos Santos (processo 2011/10071-7).

Ao Carlos Guedes, pela paciência em nos ajudar quanto aos processos FAPESP e no envio ao Comitê de Ética e Pesquisa.

À todos os professores pelo convívio durante a realização dos créditos pela amizade, apoio e ensinamentos.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira sempre pronta para nos ajudar em qualquer questionamento ou dúvida.

Ao Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho, obrigada por estar sempre pronto a nos ajudar e em especial a ajuda fundamental em minha tese.

À Faculdade de Pindamonhangaba, por sempre que precisei pude recorrer á vocês. E também por ter me ajudado na coleta das amostras deste trabalho, pois sem essa ajuda eu não teria conseguido completar o proposto, meu muito obrigada.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, que foram essenciais para qualidade da pesquisa.

Aos secretários da Seção da Pós Graduação, Rosemary de Fatima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Erena Michie Hasegawa e Ivan Oliveira Damasceno pela amizade e ajuda durante este tempo.

À todos os funcionários da biblioteca, em especial Renata Aparecida de Oliveira Couto e Silvana Alvarez, pelo auxílio na finalização do trabalho.

Aos amigos, Rodnei Denis Rossoni, Patricia Barros Pimentel e Mirian Marcolan de Mello, pelos momentos de descontração, amizade e ajuda imprescindível para conclusão dos experimentos.

À “minha” aluna de Iniciação Científica, Jéssica Diane dos Santos, pela dedicação, disponibilidade, amizade e auxílio durante toda fase experimental. Sem você, seria impossível realizar todo esse trabalho.

À todos os colegas do laboratório, Cristiane Aparecida Pereira Correia, Adeline Lacerda Jorjão, Jonatas Rafael de Oliveira, Fernanda Freire, Anna Carolina Borges Pereira da Costa, Nádia Domingues, Michele Peneluppi, Fernanda Tomé, Kely Karina, Rafaella Braga, Tamara Carneiro, Felipe Camargo, Janaína Araújo Alvarenga, Elis A. Lima Zutin, Isabela, Leilian, Marisol Veloso, Nayara e aos demais colegas pelo companheirismo e boa convivência que tivemos durante o curso.

*“Quando você se observar, à beira do desânimo, acelere o passo para frente, proibindo-se parar.
Ore, pedindo a Deus mais luz para vencer as sombras.
Faça algo de bom, além do cansaço em que se veja.
Leia uma página edificante, que lhe auxilie o raciocínio na mudança construtiva de idéias.
Tente contato de pessoas, cuja conversação lhe melhore o clima espiritual.
Procure um ambiente, no qual lhe seja possível ouvir palavras e instruções que lhe enobreçam os pensamentos.
Preste um favor, especialmente aquele favor que você esteja adiando.
Visite um enfermo, buscando reconforto naqueles que atravessam dificuldades maiores que as suas.
Atenda às tarefas imediatas que esperam por você e que lhe impeçam qualquer demora nas nuvens do desalento.
Guarde a convicção de que todos estão caminhando para adiante, através de problemas e lutas, na aquisição de experiência, e de que a vida concorda com as pausas de refazimento das nossas forças, mas não se acomoda com a inércia em momento algum.”*

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 <i>Enterococcus</i>	18
2.2 Terapia Fotodinâmica.....	21
2.3 <i>G. mellonella</i>	25
3 PROPOSIÇÃO.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Seleção dos pacientes.....	29
4.2 Coleta microbiológica das amostras do canal radicular.....	30
4.3 Isolamento das amostras.....	30
4.4 Identificação das amostras.....	31
4.5 Seleção das cepas clínicas e padrão de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> para os testes de suscetibilidade às terapias antimicrobianas.....	33
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	33
4.7 Testes de sensibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana.....	35
4.8 Análise da virulência no modelo de <i>G. mellonella</i>	36
4.8.1 <i>G. mellonella</i>	37
4.8.2 Verificação da suscetibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	37
4.8.3 Injeção de micro-organismo em <i>G. mellonella</i>	38
4.8.4 Determinação da curva de morte de <i>G. mellonella</i>	38
4.8.5 Estudo de cultura em tecidos – contagem de UFC/mL.....	39
4.9 Análise Estatística.....	40

5 RESULTADOS	41
5.1 Isolamento e identificação de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	41
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	46
5.3 Determinação da sensibilidade dos isolados à terapia fotodinâmica	49
5.4 Análise da virulência no modelo de <i>G. mellonella</i>	53
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	74
APÊNDICE	81

Santos ACC. Prevalência, virulência e sensibilidade às terapias antimicrobianas das cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isoladas de infecções endodônticas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Enterococcus faecium se tornou um dos mais temidos micro-organismos em infecções hospitalares, por apresentar maior facilidade em adquirir resistência aos antibióticos do que *E. faecalis*. Entretanto, faltam estudos voltados para o isolamento e identificação de *E. faecium* na cavidade bucal. Os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar *E. faecalis* e *E. faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas e comparar as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em relação à sensibilidade aos antibióticos convencionais e à terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT). Além disso, essas espécies foram comparadas quanto à virulência *in vivo*, utilizando o modelo de infecção experimental de *Galleria mellonella*. As cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de canais radiculares foram identificadas pelo sistema Rapid ID 32 Strep e PCR multiplex. Todos os isolados identificados como *E. faecalis* e *E. faecium*, foram testadas quanto à sensibilidade aos antibióticos pelo método E-test para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). A seguir, foram selecionadas algumas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* sensíveis e resistentes aos antibióticos de uso clínico na odontologia para testes de sensibilidade *in vitro* à terapia fotodinâmica antimicrobiana. A virulência das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* foram testadas *in vivo* no modelo de infecção experimental de *G. mellonella* por meio da análise da curva de sobrevivência das larvas e quantificação de UFC/mL de células bacterianas presentes na hemolinfa desses animais. Os dados de UFC/mL obtidos na terapia fotodinâmica e na infecção em *G. mellonella* foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisados pelo método de Log-rank. Foram realizadas coletas de 38 canais radiculares de diferentes pacientes, sendo que 22 apresentaram culturas positivas para *Enterococcus* spp. (58%). Desses pacientes, todos apresentaram *E. faecalis* e apenas 2 tinham infecções mistas por *E. faecalis* e *E. faecium*. Foram encontrados 6 isolados (27%) de *E. faecalis* resistentes aos antibióticos, sendo 3 resistentes a tetraciclina, 2 a ciprofloxacina e 1 a azitromicina. Os isolados de *E. faecium* não apresentaram resistência aos antibióticos testados. Todos os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*

testados foram sensíveis a terapia fotodinâmica com redução microbiana de 95 a 99%. Tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*, a virulência em *G. mellonella* foi dependente das cepas estudadas. Concluiu-se que *E. faecium* apresentam baixa prevalência em infecções endodônticas, sendo seus isolados sensíveis aos antibióticos convencionais e à terapia fotodinâmica. Além disso, as cepas de *E. faecium* mostraram padrão de virulência semelhante às cepas de *E. faecalis* em *G. mellonella*.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecium*. Antimicrobianos. Terapia fotodinâmica. *Galleria mellonella*.

Santos ACC. Prevalence, virulence and sensitivity to antimicrobial therapy of strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from endodontic infections [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

Abstract

Enterococcus faecium has become one of the most dreaded microorganisms in nosocomial infections, due to its greater ease in acquiring resistance to antibiotics than *E. faecalis*. However, lack of studies focused on the isolation and identification of *E. faecium* in the oral cavity. The objectives of this study was to isolate and identify *E. faecalis* and *E. faecium* in root canals with endodontic infections and to compare strains of *E. faecalis* and *E. faecium* in sensitivity to conventional antibiotics and antimicrobial photodynamic therapy (PDT). Furthermore, these species were compared for virulence in vivo, using the model of experimental infection of *Galleria mellonella*. The strains of *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from root canals were identified by the Rapid ID 32 Strep system and multiplex PCR. All isolates identified as *E. faecalis* and *E. faecium* were tested for antibiotic susceptibility E-test method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC). Next, we selected some strains of *E. faecalis* and *E. faecium* sensitive and antibiotic-resistant clinical use in dentistry for in vitro susceptibility testing to antimicrobial photodynamic therapy. The virulence of strains of *E. faecalis* and *E. faecium* were tested in in vivo experimental model of infection of *G. mellonella* by analysis of larval survival curve and quantitation of CFU/mL bacterial cells present in the hemolymph of these animals. Data from CFU/mL obtained in photodynamic therapy and infection in *G. mellonella* were subjected to analysis of variance and Tukey test. The data on the survival of *G. mellonella* curves were analyzed by log-rank method. Samples of 38 root canals from different patients were performed and 22 had cultures positive for Enterococcus spp. (58%). Of these patients, all showed *E. faecalis* and only 2 had mixed infections with *E. faecalis* and *E. faecium* 6 isolates (27%) *E. faecalis* resistant to antibiotics were found, 3 resistant to tetracycline, ciprofloxacin and two azithromycin 1. *E. faecium* isolates showed no resistance to the antibiotic tested. All isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* tested were sensitive to photodynamic therapy microbial reduction of 95 99%. Both *E. faecalis* and *E. faecium* for the virulence in *G. mellonella* was dependent on the strains studied. We conclude that *E.*

faecium have low prevalence in endodontic infections, and their isolates sensitive to conventional antibiotics and photodynamic therapy. Furthermore, *E. faecium* strains showed similar pattern of the strains of *E. faecalis* virulence in *G. mellonella*.

Keywords: Enterococcus faecalis. Enterococcus faecium. Antimicrobials. Photodynamic Therapy. Galleria mellonella.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* é constituído por mais de 30 espécies, das quais *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* correspondem à maioria dos isolados de infecções nosocomiais, sendo que as outras espécies deste gênero representam apenas 5 a 10% dos isolados (Rodriguez et al., 2013). Essas duas espécies de maior importância médica, *E. faecium* e *E. faecalis*, estão frequentemente relacionadas com bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites (Kense, Landmon, 2011; Zou et al., 2011). Desse modo, *Enterococcus* representam o terceiro patógeno nosocomial mais prevalentes em todo o mundo (Bereket et al., 2012).

A prevalência de infecções hospitalares por *Enterococcus spp.* aumentaram significativamente nos últimos anos, principalmente, devido à sua resistência intrínseca aos antibióticos, como cefalosporina e aminoglicosídeos, e à resistência adquirida à diversos antimicrobianos, como a vancomicina. O desenvolvimento de resistência aos antibióticos de uso clínico em odontologia tem levando a uma redução drástica nas opções terapêuticas para pacientes infectados com *Enterococcus*, tornando o tratamento dessas infecções um importante alvo de investigação científica (Rodriguez et al., 2013).

As infecções enterocócicas hospitalares podem ser divididas em duas fases distintas, a primeira surgiu no final da década de 1970 e foi associada com a introdução da terceira geração de cefalosporinas. Durante esta época, *E. faecalis* foi responsável por 90-95% dos isolados clínicos de *Enterococcus*. A segunda fase teve início na década de 1990 e estende-se até os dias de hoje, estando associada ao

aumento do uso de vancomicina e outros antibióticos de amplo espectro (Willems, Schaik, 2009). Nesta fase, *E. faecium* passou a ser responsável por grande parte das infecções enterocócicas por apresentar maior resistência à vancomicina e ampicilina do que *E. faecalis* (Arias, Murray, 2012).

Em odontologia, a presença de *Enterococcus* no interior de canais radiculares tem sido associada às infecções endodônticas persistentes (Dahlén et al., 2012), o que tem induzido o desenvolvimento de pesquisas para avaliar a efetividade da ação antimicrobiana de medicamentos intracanaís contra estes micro-organismos (Kopper, 2007). A persistência das infecções endodônticas tem sido atribuída à permanência dessas bactérias em áreas de difícil acesso, como lacunas de reabsorção, cimento, canais laterais, túbulos dentinários e lesão periapical (Costa et al., 2010). Embora as infecções oportunistas por *Enterococcus* tenham aumentado significativamente nos últimos anos, o papel da cavidade bucal como reservatório desses micro-organismos ainda precisa ser melhor estudado (Kouidhi et al., 2011).

Andrade et al. (2011) estudaram a prevalência de *Enterococcus spp.* em 35 canais radiculares com necrose pulpar. Em 33 canais (94%) foram encontrados *E. faecalis* e apenas 1 canal (3%) *E. faecium*. A espécie *E. faecalis* foi majoritária, estando relacionada aos sinais e sintomas da infecção endodôntica. Na literatura existem muitos estudos que comprovaram a alta prevalência de *E. faecalis* em canais radiculares (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Noda et al., 2000; Pinheiro et al., 2003), entretanto poucos estudos avaliaram a prevalência de *E. faecium* (Andrade et al., 2011).

O aumento da resistência das bactérias aos antibióticos tem emergido como um dos mais importantes desafios clínicos deste século, destacando a necessidade no desenvolvimento de tratamentos antimicrobianos alternativos, como a terapia fotodinâmica (PDT) (Oriel e Nitzan, 2010). Esta terapia consiste na associação de um

fotossensibilizador exógeno e uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, iniciando uma reação celular fotoquímica que causa danos oxidativos às células de organismos procarióticos e eucarióticos (Souza RC et al., 2010). A PDT possui várias características favoráveis para o tratamento de infecções originadas por micro-organismos patogênicos, incluindo um amplo espectro de ação, inativação eficiente de cepas resistentes aos antibióticos e baixo potencial mutagênico (Junqueira et al., 2009; Dovigo et al., 2009).

Na literatura existem vários estudos sobre a aplicação da terapia fotodinâmica em cepas de *E. faecalis* (Foschi et al., 2007; Souza LC et al., 2010; Nunes et al., 2011). Garcez et al. (2013) estudaram a terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT), utilizando uma fibra difusora óptica, para o tratamento de infecções endodônticas. Foram utilizados 50 dentes recém-extraídos, que após esterilizados, foram contaminados com *E. faecalis* durante três dias. Amostras microbiológicas do canal foram feitas antes e depois do tratamento endodôntico com PDT. Os resultados demonstraram redução de 85 a 99% desse micro-organismo no canal radicular, sugerindo que a utilização da PDT no tratamento endodôntico é de grande eficácia para o controle de *E. faecalis*.

Atualmente, o modelo invertebrado de infecção experimental de *G. mellonella* tem sido considerado um método inovador e muito promissor para o estudo da virulência de patógenos microbianos. *G. mellonella* tem sido usada com sucesso para estudar a patogênese da infecção de vários patógenos, incluindo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. (Fuchs et al., 2010; Abranches et al., 2011; Olsen et al., 2011; Junqueira et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* em infecções endodônticas, bem

como comparar os isolados de *E. faecalis* com os isolados de *E. faecium* em relação à sensibilidade às terapias antimicrobianas e à virulência no modelo de infecção experimental em *G. mellonella*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* compõe parte da microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis, e estão amplamente distribuídos no meio ambiente, tais como solo, água, alimentos e plantas. São encontrados no trato gastrointestinal de seres humanos como microrganismos comensais, mas podem se tornar patógenos oportunistas em indivíduos hospitalizados, cujo sistema imunológico esteja comprometido ou que tenham recebido terapia antibiótica de largo espectro por períodos prolongados (Arias et al., 2010; Castillo-Rojas et al., 2013).

Enterococcus são reconhecidamente agentes etiológicos de endocardite, meningite, bacteriemia, infecções de ferida e do trato urinário, especialmente em pacientes imunossuprimidos e hospitalizados (Michaux et al., 2011; Lindenstrauss et al., 2011). Em Odontologia, são associados à doença periodontal crônica e infecções endodônticas recorrentes (Zhu et al., 2010; Dahlén et al., 2012).

As espécies de *Enterococcus* tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao aumento de cepas resistentes aos vários antibióticos, sendo reconhecidas atualmente como patógenos humanos emergentes. Dentre o gênero *Enterococcus*, a espécie *E. faecalis* está em maior número no trato gastrointestinal, seguida por *E. faecium*. No entanto, *E. avium* e *E. hirae*, bem como outras espécies de Enterococos, também são frequentemente encontradas em amostras de fezes humanas (Nes et al., 2014).

Biofilmes formados por *Enterococcus* são comumente encontrados em dispositivos médicos, sendo conhecidos como uma das principais causas de infecções nosocomiais. Biofilmes são comunidades tridimensionais de micro-organismos embebidos em uma matriz extracelular, presentes geralmente sobre uma superfície sólida. São constituídos de 15 a 20% de micro-colônias bacterianas, 75 a 80% de matriz ou glicocálice, e em menor quantidade de polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, glicoproteínas salivares, proteínas, pigmentos e restos alimentares (Santos, Jorge, 2012).

Já foram isoladas bactérias do gênero *Enterococcus* de cateteres, marca-passos cardíacos, próteses valvulares cardíacas e aparelhos ortopédicos, que estão associados com várias doenças humanas, tais como endocardite, infecções de feridas por queimadura, otite crônica média com efusão e fibrose cística.

Em estudo realizado em Roma (Itália), verificou-se que 80% das cepas de *E. faecalis* e 48% das cepas de *E. faecium* isoladas a partir de pacientes contendo infecções por esses micro-organismos foram capazes de formar biofilmes (Baldassarri et al., 2001). Na Espanha, 57% de *E. faecalis* derivados a partir de vários isolados clínicos foram capazes de produzir biofilmes (Toledo-Arana et al., 2001). Em Sardenha (Itália), a produção de biofilme foi identificada entre 87% dos isolados clínicos de *E. faecalis* e 16% de *E. faecium* (Duprè et al., 2003). Nos Estados Unidos, Mohamed et al. (2004) relataram que 93% de cepas de *E. faecalis* isoladas a partir de material clínico produziam biofilmes. Na Polônia, 59% de *E. faecalis* isolados de coleta a partir de amostras clínicas produziam biofilmes (Dworniczek et al., 2005). Um estudo realizado em um hospital na Índia mostrou que 44 dos 171 isolados (26%) de *E. faecalis* foram capazes de formar biofilmes, enquanto que nenhum dos 25 isolados de *E. faecium* foram produtores de biofilmes (Prakash et. al., 2005). Sendo assim, esses dados sugerem que *E. faecalis*, frequentemente, produzem mais biofilmes do que *E. faecium*.

Durante a década de 1980 e início de 1990, mais de 90% das infecções enterocócicas nosocomiais eram causadas por *E. faecalis*, e *E. faecium* ocupava o segundo lugar com aproximadamente 5 a 10%. Devido à grande facilidade de *E. faecium* em adquirir resistência aos antibióticos esse quadro mudou. Atualmente, entre os isolados clínicos de infecções enterocócicas, *E. faecium* é responsável por 38 a 75% dos casos (Willems et al., 2011). A capacidade intrínseca e a facilidade em adquirir resistência aos diversos antibióticos fazem com que *E. faecium* seja um dos mais temidos micro-organismos em infecções hospitalares (Panesso et al., 2010).

Devido à resistência adquirida aos antibióticos, como a vancomicina, *E. faecium* está sendo isolado de 38 a 75% das infecções por *Enterococcus*, portanto *E. faecium* está tornando-se uma causa tão comum de infecção hospitalar quanto *E. faecalis* (Willems et al., 2011). O número de infecções por *Enterococcus* resistentes à vancomicina em hospitais dos EUA aumentou de 9.820 em 2000 para 21.352 em 2006 (Ramsey, Zielberg, 2009), e atualmente a porcentagem de isolados resistentes à vancomicina corresponde a 80% das cepas de *E. faecium* (Arias, Murray, 2008) e apenas 5% das cepas de *E. faecalis* (Hidron et al., 2008).

Esses micro-organismos também possuem uma grande importância na odontologia, pois são encontrados em bolsas periodontais profundas e em dentes com necessidade de tratamento endodôntico. São bastante frequentes principalmente em dentes que necessitam de tratamento endodôntico secundário, onde houve insucesso no primeiro tratamento (Dahlén et al., 2012).

A importância clínica de infecções endodônticas por *Enterococcus* tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de identificar, controlar e tratar a sua ocorrência. No entanto, essas espécies bacterianas são de difícil cultivo e identificação dentro das técnicas de diagnóstico convencionais, o que pode dificultar ou mesmo

impossibilita sua detecção, podendo conduzir a uma estimativa errônea referente ao papel de determinadas espécies bacterianas envolvidas na infecção do sistema de canais radiculares (Silva et al., 2008). Nesse contexto, surgem os métodos baseados na análise de DNA bacteriano, que têm sido aplicados com sucesso (Delgado et al., 2004). A identificação ao nível de espécie, utilizando PCR com iniciadores específicos é um método valioso e pode substituir os testes microbiológicos convencionais que são de outro modo necessários para identificar as espécies utilizando abordagens fenotípicas (Jackson et al., 2004). PCR multiplex com primers específicos é uma ferramenta molecular simples que permite a identificação rápida e precisa de *Enterococcus* (Layton et al., 2010; Castillo-Rojas et al., 2013).

Na Odontologia, *E. faecalis* é considerado a espécie de *Enterococcus* mais frequentemente isolada das lesões endodônticas e tem sido amplamente estudado quanto ao padrão de sensibilidade antimicrobiana aos antibióticos convencionais e terapia fotodinâmica (Pinheiro et al., 2004; Foschi et al., 2007; Souza RC et al., 2010; Nunes et al., 2011; Garcez et al., 2013). Entretanto, faltam estudos voltados para o isolamento e identificação de *E. faecium* na cavidade bucal, como em canais radiculares. Além disso, existe a necessidade de conhecer os isolados bucais de *E. faecium* quanto ao padrão de sensibilidade aos antibióticos convencionais utilizados em odontologia, sensibilidade à vancomicina para identificação de cepas vancomicina-resistentes (VRE) na cavidade bucal e sensibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana, que tem sido considerada um tratamento alternativo para as cepas de micro-organismos resistentes aos antibióticos.

2.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é um método de tratamento a base de luz que está em desenvolvimento, podendo ser aplicada em diversas áreas, como em oncologia, dermatologia e oftalmologia, e tem sido investigada como uma terapia antimicrobiana (Kato et al., 2013).

A terapia fotodinâmica está fundamentada na associação de agentes fotossensibilizadores e luz no espectro visível ou infravermelho, e tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Inicialmente, essa terapia foi descrita para promover ação letal sobre células do câncer, mas está sendo dada grande atenção ao seu efeito antimicrobiano (Allison, Sibata, 2010). Devido ao crescente número de micro-organismos resistentes aos antibióticos, pesquisas estão sendo focadas na PDT como uma modalidade alternativa de tratamento para as doenças infecciosas (Kharkwal et al., 2011).

A terapia fotodinâmica envolve três componentes: uma fonte de luz, um agente fotossensibilizador e o oxigênio. O fotossensibilizador é administrado ao paciente e irradiado com luz em comprimento de onda específico, com isso, o fotossensibilizador passa do estado fundamental de baixa energia para estado singlete reativo (Konopka, Goslinski, 2007; Perussi, 2007). A habilidade de um componente em absorver luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar toxicidade ao hospedeiro (Al-Ahmad et al., 2013). Os principais Fotossensibilizadores encontrados na literatura são os derivados da hematoporfirina, as fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno), as cianinas (indocianina verde), os fitoterápicos (azuleno) e as ftalocianinas (Garcez et al., 2003).

Teichert et al. (2002) avaliaram a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina na fotossensibilização letal de micro-organismos patogênicos, utilizando estes corantes em diversas concentrações associados a um laser de Argônio com comprimento de onda 630 nanômetro e um laser diodo com comprimento de onda 664 nanômetro com fluência de energia variando entre 10 e 60 J/cm², e intensidade de potência variando de 50 a 100 mW/cm². As concentrações dos corantes foram: 10, 20, 30 40, 50, 100, 150 e 200 µM. A terapia fotodinâmica foi aplicada em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores verificaram que todos os micro-organismos foram eliminados em algum grau quando expostos ao laser na presença dos fotossensibilizadores. No entanto, a atividade antimicrobiana dependeu do fotossensibilizador utilizado, da sua concentração, da fluência e intensidade de potência do laser, bem como da espécie bacteriana envolvida.

A utilização do laser de baixa potência associado a um corante com características fotossensibilizadoras tem sido utilizada na endodontia (Walsh, 2003). O interesse pela utilização da PDT na endodontia está relacionado principalmente ao efeito antimicrobiano comprovado desta terapia, visto que ela não promove resistência microbiana, é uma técnica de fácil aplicação, é indolor, e soma a todas essas características os efeitos benéficos advindos da terapia com laser (Soukos et al., 2006).

Silbert et al. (2000) testaram a Terapia Fotodinâmica quanto à sua capacidade de reduzir a contaminação bacteriana em canais radiculares. Após instrumentação e esterilização, raízes de dentes humanos foram divididas em dois grupos, no qual o primeiro foi inoculado com uma suspensão de *Streptococcus mutans* e o segundo, com uma suspensão de *Enterococcus faecalis*. O fotossensibilizador azul de metileno associado ao laser de diodo de Fosfato de Índio Gálio Alumínio

(IGaAIP), com comprimento de onda de 670 nanômetro, foi aplicado por períodos de 30 a 240 segundos. Concluiu-se que a PDT pode ser um método efetivo de redução bacteriana intracanal, porém os parâmetros da PDT devem ser ajustados para se obter uma eliminação mais eficaz de *E. faecalis*.

Em outro estudo, Garcez (2002) avaliaram o potencial de redução bacteriana intracanal de canais contaminados com *E. faecalis*. Vinte dentes extraídos foram tratados com uma pasta composta de azuleno 25% e Endo-PTC e foi irradiado por laser diodo com comprimento de onda de 685 nm durante 5 minutos. Foi observada redução bacteriana de 100% após a terapia fotodinâmica.

Diante de todos os estudos encontrados na literatura, conclui-se que a terapia fotodinâmica tem um efeito significativo na redução de micro-organismos, principalmente *E. faecalis*, mas faltam estudos de terapia fotodinâmica sobre *E. faecium*.

2.3 *Galleria mellonella*

Atualmente, o modelo invertebrado de infecção experimental de *G. mellonella* tem sido considerado um método inovador e muito promissor para o estudo da virulência de patógenos microbianos. Até o momento, modelos *in vivo* para o estudo de infecções microbianas eram realizados em animais vertebrados, como ratos e camundongos. Nos últimos anos, modelos de infecção em invertebrados foram desenvolvidos por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo, facilidade de manuseio, possibilidade de trabalho em grande escala e por não envolverem questões éticas. Entre os vários modelos de invertebrados podemos citar a ameba *Acanthamoeba castellanii*, o nemátodo *Caenorhabditis elegans* e os insetos *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* (Cotter et al., 2000; Pukkila-Worley et al., 2009; Rowan et al., 2009; Fuchs et al., 2010; Junqueira, 2012).

Galleria mellonella tem sido utilizada com sucesso como modelo para a patogênese microbiana porque apresenta tamanho suficiente para injeção de um inóculo padronizado de *C. albicans* ou de medicamentos antifúngicos. Além disso, as lagartas de *G. mellonella* apresentam hemolinfa com vários tipos de hemócitos, que possuem um papel importante na defesa contra patógenos. Em relação aos outros modelos de invertebrados, *G. mellonella* apresenta a vantagem de poder ser mantida em temperaturas entre 25 a 37 graus celsius, aproximando-se das condições de temperatura em que os fungos são encontrados na natureza ou no hospedeiro (Mylonakis, Aballay, 2005; Fuchs, Mylonakis, 2010; Mylonakis, 2008; Fuchs et al., 2010).

G. mellonella apresenta sistema imunológico semelhante ao encontrado em seres vertebrados, sendo que a resposta imune é imediatamente acionada quando algum agente atravessa sua cutícula. A

resposta imunológica desse animal é composta por sistema imune humoral e celular. O componente celular é representado pela ação de células fagocitárias denominadas hemócitos, as quais são encontradas circulando livremente pela hemolinfa do inseto e atuam envolvendo e fagocitando células invasoras. O componente humoral é composto essencialmente por peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês "*antimicrobial peptides*"), os quais atuam nas células bacterianas ou fúngicas que invadem o organismo e atingem a hemolinfa. A densidade de hemócitos circulantes na hemolinfa pode ser utilizada como indicativo de infecção (Olsen et al., 2011; Desalermos et al., 2012). Devido às similaridades em relação à resposta imune, os resultados obtidos em insetos podem ser comparados com os obtidos em mamíferos (Reeves et al., 2011; Bergin et al., 2006).

Entre os micro-organismos que tiveram sua patogênese estudada em *G. mellonella* pode-se destacar: *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. (Fuchs et al., 2010; Abranches et al., 2011; Olsen et al., 2011; Junqueira et al., 2011).

Devido às suas limitações, o modelo hospedeiro de *G. mellonella* não pode substituir completamente modelos de mamíferos de experimentação. Entretanto, os invertebrados podem servir como um fácil e rápido método de triagem para os estudos da virulência dos micro-organismos e descobertas de novas alternativas para o tratamento das doenças infecciosas (Arvanitis et al., 2013).

A compreensão da virulência das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* presentes na cavidade bucal é muito importante, uma vez que essas cepas podem ser responsáveis por uma infecção sistêmica em pacientes imunossuprimidos. Atualmente, o modelo hospedeiro de infecção experimental em *G. mellonella* representa uma técnica inovadora e

promissora para o estudo da virulência de micro-organismos e tem sido muito utilizada em estudos de medicina. Entretanto, esse novo modelo hospedeiro precisa ser explorado para o estudo de micro-organismos de interesse odontológico.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi isolar e identificar cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas e testar esses isolados quanto à sensibilidade as terapias antimicrobianas e à virulência no modelo hospedeiro de *Galleria mellonella*.

Os objetivos específicos serão:

- a) isolar e Identificar cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas;
- b) determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antibióticos de uso clínico em odontologia para diferentes isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*;
- c) avaliar a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) sobre *E. faecalis* e *E. faecium*, comparando isolados sensíveis e resistentes aos antibióticos convencionais em relação a sensibilidade à PDT;
- d) analisar a virulência das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* no modelo de infecção experimental de *G. mellonella* por meio da curva de sobrevivência e contagem de UFC/mL em hemolinfa de *G. mellonella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos pacientes

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/UNESP Campus de São José dos Campos (ANEXO A). Todos os pacientes foram informados da pesquisa e os que concordarem em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

Os pacientes foram selecionados por especialistas da Clínica de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José dos Campos e da Faculdade de Pindamonhangaba (FAPÍ). Foram incluídos no estudo, pacientes adultos com mais de 21 anos de idade, sem distinção de sexo ou raça e apresentando no arco dentário pelo menos um elemento dentário com indícios clínicos e radiográficos de necessidade de tratamento endodôntico. Os pacientes selecionados foram submetidos a anamnese e exames clínicos adequados, além de completa avaliação radiográfica bucal panorâmica e periapical. Os pacientes foram excluídos quando apresentaram qualquer doença que contra-indicasse o tratamento endodôntico ou utilizam medicação antibiótica por pelo menos três meses antes do procedimento endodôntico (APÊNDICE A).

Foram selecionados 38 dentes para realização da coleta microbiológica que apresentaram integridade do elemento ou presença de selamento com material restaurador, ausência de bolsas periodontais com profundidade maior que 4 mm devido à possibilidade da lesão endo-

periodontal, e possibilidade de realização de isolamento absoluto adequado.

No dia da abertura coronária para o tratamento endodôntico, foi feita a profilaxia no elemento alvo e bochecho com solução de gluconato de clorexidina (0,12%) durante um minuto, após o isolamento absoluto foi realizada a anti-sepsia do dente e ao redor dele com Peróxido de hidrogênio 30%, Hipoclorito de sódio 2,5% e Tiosulfato de sódio 5%, por 30 s cada um separadamente.

4.2 Coleta microbiológica das amostras do canal radicular

Após a abertura coronária e a exposição do tecido pulpar, as amostras foram coletadas com o auxílio de 4 cones de papel absorventes esterilizados e de numeração compatível com o canal radicular (Endpoints Ind. Com. Ltda., RJ), os quais foram introduzidos no canal radicular até o comprimento pré-odontométrico (estabelecido na odontometria), permanecendo por 60 segundos.

Em seguida os quatro cones foram transferidos para tubos contendo 3 mL do meio de solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) e colocados no gelo, por período máximo de 3 h, e assim, transportados para o laboratório de microbiologia.

4.3 Isolamento das amostras

As amostras foram homogeneizadas em vortex por 60 segundos e diluídas em solução salina tamponada. Alíquotas de 0,1 mL de diluições pré-estabelecidas (10^1 , 10^2 , 10^3) foram transferidas e

semeadas em duplicata, em placas contendo meio seletivo para *Enterococcus* (Enterococcus agar). As placas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, colônias sugestivas de *E. faecalis* e *E. faecium* pela morfologia e coloração de Gram, foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Infuso Cérebro-Coração Inclinado (Difco, Detroit, EUA) para realização dos testes de identificação fenotípica. Além disso, para a confirmação por identificação molecular, essas cepas foram semeadas em Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI)80% com Glicerol 20% e mantidas a -80 °C.

4.4 Identificação das amostras

A identificação fenotípica foi realizada pelo sistema Rapid ID 32 Strep (Bio Merieux, França) seguindo as recomendações do fabricante. As cepas identificadas como *E. faecalis* e *E. faecium* foram confirmadas pelo método de identificação molecular (PCR Multiplex).



Figura 1 – Identificação fenotípica pelo sistema API 20 STREP utilizados para os isolados de *Enterococcus* spp. coletados dos canais radiculares com infecções endodônticas.

Após o plaqueamento em meio seletivo para *Enterococcus*, as colônias foram suspensas em 180 µL do tampão de lise contendo 20 mg/mL lisozima, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA e 1,2% Triton X-100, e posteriormente, incubadas a 37°C por 30 minutos. O DNA cromossômico foi extraído pelo QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) conforme recomendações do fabricante, e sua quantificação realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ND-800, Thermo Scientific).

O método de PCR Multiplex foi utilizado para identificar e diferenciar as espécies de *E. faecalis* e *E. faecium* conforme descrito por Layton et al. (2010). Os iniciadores (primers) que foram utilizados estão descritos no quadro 1. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% em TBE, corados por brometo de etídio e visualizados em transluminador.

Quadro 1 - Descrição dos primers que foram utilizados para identificação de *E. faecalis* e *E. faecium* (Layton et al., 2010)

Primer	Sequência de nucleotídeos	Alvo	Tamanho do Amplicon
FL- F FL- R	5' ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC 3' 5' TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG 3'	<i>E. faecalis</i>	360 pb
FM- F FM- R	5' ACA ATA GAA GAA TTA TTA TCT G 3' 5' CGG CTG CTT TTT TGA ATT CTT CT 3'	<i>E. faecium</i>	214 pb

4.5 Seleção das cepas clínicas e padrão de *E. faecalis* e *E. faecium* para os testes de suscetibilidade às terapias antimicrobianas

Após os testes de identificação fenotípicos e genotípicos, todas as cepas identificadas como *E. faecalis* e *E. faecium* foram submetidas aos ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC). A seguir, foram selecionadas, 5 cepas de *E. faecalis* sensíveis a todos antibióticos testados e 5 cepas resistentes a pelo menos 1 antibióticos testado, e 2 cepas de *E. faecium* sensíveis a todos os antibióticos testados para realização dos testes de sensibilidade à terapia fotodinâmica (PDT). As cepas foram selecionadas de acordo com os resultados obtidos no MIC, de modo a incluir nos testes de PDT cepas sensíveis e resistentes aos antibióticos mais utilizados na odontologia.

Como micro-organismos controle para todos os experimentos subsequentes, foram utilizadas cepas padrão cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, sob-registros *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) e *Enterococcus faecium* (ATCC 6569).

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Todos os isolados obtidos foram testados quanto à sua sensibilidade aos antibióticos por meio do método E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia). Foram testados antibióticos de uso clínico, como amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, tetraciclina e ciprofloxacina. O antibiótico vancomicina também foi incluído com o objetivo de identificar cepas resistentes à vancomicina (VRE) na cavidade bucal.

A fita do E-test pode detectar um MIC que varia de 0,016 a 256 µg/mL, com um total de 29 diferentes concentrações, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição.

Para o preparo do inóculo, após 24 horas de incubação das cepas em placas de Enterococcus ágar, as colônias bacterianas foram transferidas para o Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI) e agitadas para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (Neflobac, Brasil). Essa suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 800 nm. Placas contendo 4 mm de espessura de ágar Mueller-Hinton foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, utilizando-se um *swab* estéril, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test, previamente removidas do congelador e mantidas a temperatura ambiente por cerca de 20 minutos, foram distribuídas nas placas com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada. O experimento foi executado em duplicata.

As placas foram incubadas em condições de aerobiose, e a leitura realizada após 20 horas em estufa bacteriológica a 37 °C. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (MICs) foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento. A interpretação dos valores dos MICs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada segundo o guia de interpretação da NCCLS (M100 S12).

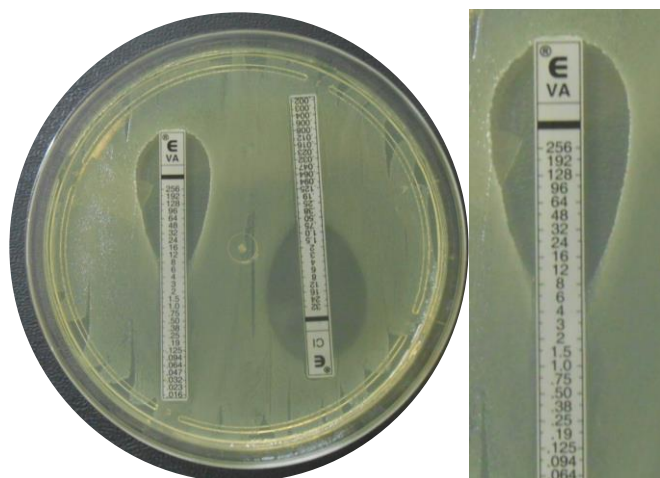


Figura 2 – Halos de inibição das cepas de *Enterococcus* spp. pelo método E test.

4.7 Testes de sensibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana

Para realização da fotossensibilização *in vitro* foi utilizada a metodologia previamente descrita por Souza LC et al. 2010. Como fotossensibilizador foi utilizado azul de metileno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 300 μ M (Souza RC et al., 2010). A fonte de luz foi um laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), correspondente à faixa de comprimento de alta absorção por esse fotossensibilizador, potência de 50 mW e densidade de energia de 15 J/cm².

Foi preparada suspensão de cada cepa de micro-organismo contendo 10⁶ células/mL. Para o preparo dessa suspensão, a cepa do micro-organismo foi semeada em Enterococcus ágar e incubada a 37 °C por 48 horas. A seguir, esses micro-organismos foram cultivados em Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI) por 24 horas a 37 °C. O crescimento foi suspenso em 5 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS) e centrifugado a 5000 rpm/g durante 10 minutos, desprezando-se o

sobrenadante. Esse procedimento foi repetido e o sedimento ressuspenso em 5 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 760 nm.

Em placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa, foram adicionados 0,1 mL da suspensão de cada cepa de micro-organismo e 0,1 mL do fotossensibilizador ou de PBS. A seguir, a placa contendo as amostras foi agitada durante 5 minutos em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo de cada poço foi irradiado de acordo com os grupos seguintes grupos: Fotossensibilizador e Laser (F+L+), Solução fisiológica e Laser (F-L+), Fotossensibilizador sem Laser (F+L-) e Solução fisiológica sem Laser (F-L-). Em cada grupo foram realizados 8 ensaios por grupo.

A irradiação das amostras foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Durante todo o experimento foi mantido ambiente escuro e utilizado um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço, evitando-se espalhamento de luz.

Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar BHI. Após incubação a 37 °C por 24 horas, foi feita a contagem das unidades formadora de colônias (UFC/mL).

4.8 Análise da virulência no modelo de *G. mellonella*

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Fuchs et al. (2010). Foram testadas 5 cepas de *E. faecalis* sensíveis e 5

cepas resistentes aos antibióticos testados e foram testadas 2 cepas de *E. faecium* sensíveis aos antibióticos. Também foi testado como controle uma cepa padrão (ATCC) de cada micro-organismo.

4.8.1 *Galleria mellonella*

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 250 mg cultivadas no laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos- UNESP. Foram utilizadas 16 lagartas de *G. mellonella* para cada grupo e condição experimental (Figura 3).

4.8.2 Verificação da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção por *E. faecalis* e *E. faecium*

Inicialmente, foi realizada uma análise da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção por cepas padrão de *E. faecalis* e *E. faecium* para determinação da concentração letal de cada espécie bacteriana nesses animais. Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* várias suspensões padronizadas de *E. faecalis* ou *E. faecium* em diferentes concentrações (10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 células/mL). Essas suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro 10^6 células/mL. Um inóculo de 10 μ L de cada suspensão foi injetado em *G. mellonella* para determinação da curva de morte conforme foi descrito a seguir.

4.8.3 Injeção de micro-organismos em *G. mellonella*

Um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de micro-organismo foi injetado na hemolinfa de cada lagarta através da última prolegue esquerda, utilizando seringa Hamilton de 10 µL (Figura 4). Em todos os experimentos foi realizado um grupo inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante todo o experimento. Todas as lagartas estavam sem alimentação em todo período do experimento.

4.8.4 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Após a inoculação, as lagartas foram armazenadas em placa de Petri e incubadas a 37 °C em estufa e o número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As lagartas foram retiradas após serem consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A morte de todas as lagartas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinaram o término do experimento.

4.8.5 Estudo de cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL

Para quantificar o número de cada cepa de *E. faecalis* e *E. faecium* presente na infecção em *G. mellonella*, as células bacterianas foram extraídas da hemolinfa nos tempo de 0, 12 e 24 horas após as larvas serem infectadas. Em cada tempo indicado, 5 lagartas sobreviventes por grupo foram perfuradas por meio de uma lâmina de bisturi para remoção da hemolinfa. A hemolinfa das 5 lagartas foram acondicionadas em tubos Eppendorf com um volume final de cerca de 100 μ L. Em seguida, a hemolinfa extraída foi homogeneizada e diluída serialmente. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de petri contendo meio BHI (Himedia, Mumbai, India). As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C e posteriormente foi feita a contagem das colônias para o cálculo de UFC/mL. Todos os ensaios de contagem de UFC/mL foram realizados em triplicata.



Figura 3 - Modelo de invertebrado: larvas de *G. mellonella* em placa de Petri.



Figura 4 - Inoculação da suspensão de micro-organismos para indução de infecção experimental em *G. mellonella*.

4.9 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados de UFC/mL foi realizado Análise de Variância e teste de Tukey, utilizando-se o Programa Minitab. Em relação aos experimentos de sobrevivência em *G. mellonella*, foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel - Cox) utilizando o Programa Graph Pad Prism. Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação de *E. faecalis* e *E. faecium*

Foram realizadas coletas de 38 canais radiculares de diferentes pacientes, sendo que 22 apresentaram culturas positivas para *Enterococcus* spp. (58%), conforme representado na Tabela 1 e Figuras 5 e 6.

A seguir, foi realizada a identificação fenotípica dos isolados pelo sistema API 20 STREP e confirmação por identificação molecular (PCR Multiplex). Os resultados estão representados na Tabela 2 e Figuras 7 e 8. Dos 22 isolados de *Enterococcus* spp, 2 foram identificados como *E. faecium*, sendo encontrado no paciente 4 e 7, juntamente com isolados de *E. faecalis*, portanto, esses pacientes possuíam infecção mista com ambos os micro-organismos estudados.

Tabela 1 - Número de culturas positivas para *Enterococcus* spp. coletadas dos canais radiculares com infecções endodônticas

Pacientes	Vitalidade Pulpar	Estágio da infecção	Cultura*
1	Morta	Primária	+
2	Morta	Primária	+
3	Morta	Primária	+
4	Morta	Primária	+
5	Viva	Primária	+
6	Viva	Primária	+
7	Morta	Primária	+
8	Morta	Primária	+
9	Morta	Secundária	+
10	Viva	Primária	-
11	Morta	Primária	-
12	Morta	Secundária	-
13	Viva	Primária	-
14	Morta	Primária	+
15	Morta	Primária	+
16	Morta	Primária	-
17	Morta	Primária	-
18	Morta	Secundária	+
19	Morta	Primária	-
20	Morta	Primária	-
21	Viva	Primária	-
22	Morta	Primária	-
23	Morta	Secundária	+
24	Morta	Primária	+
25	Morta	Secundária	+
26	Morta	Primária	+
27	Morta	Primária	+
28	Morta	Primária	-
29	Viva	Primária	+
30	Morta	Secundária	+
31	Viva	Primária	-
32	Viva	Primária	-
33	Viva	Primária	-
34	Morta	Primária	-
35	Morta	Secundária	-
36	Viva	Primária	+
37	Morta	Primária	+
38	Viva	Primária	+

*Culturas positivas (+) e culturas negativas (-) para *Enterococcus* spp.

Coleta de *Enterococcus spp.*

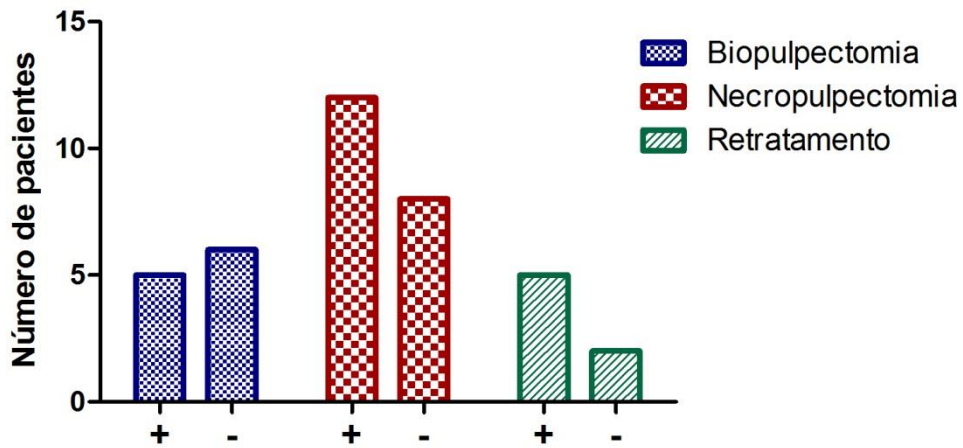


Figura 5 - Coleta de *Enterococcus spp.* de 38 pacientes que apresentavam canais radiculares com polpa viva (biopulpectomia), polpa morta (necropulpectomia) ou necessidade de retratamento endodôntico. Culturas positivas (+) e culturas negativas (-) para *Enterococcus spp.*

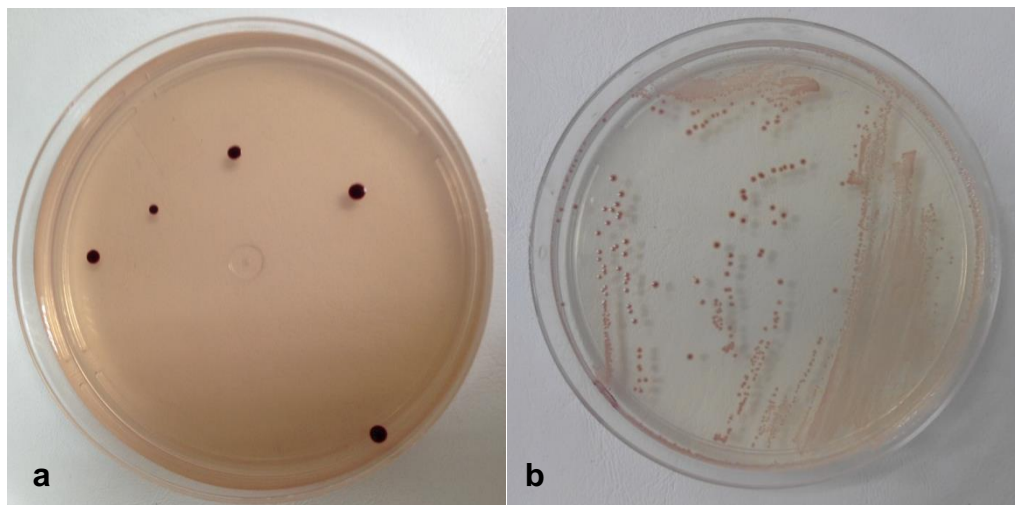
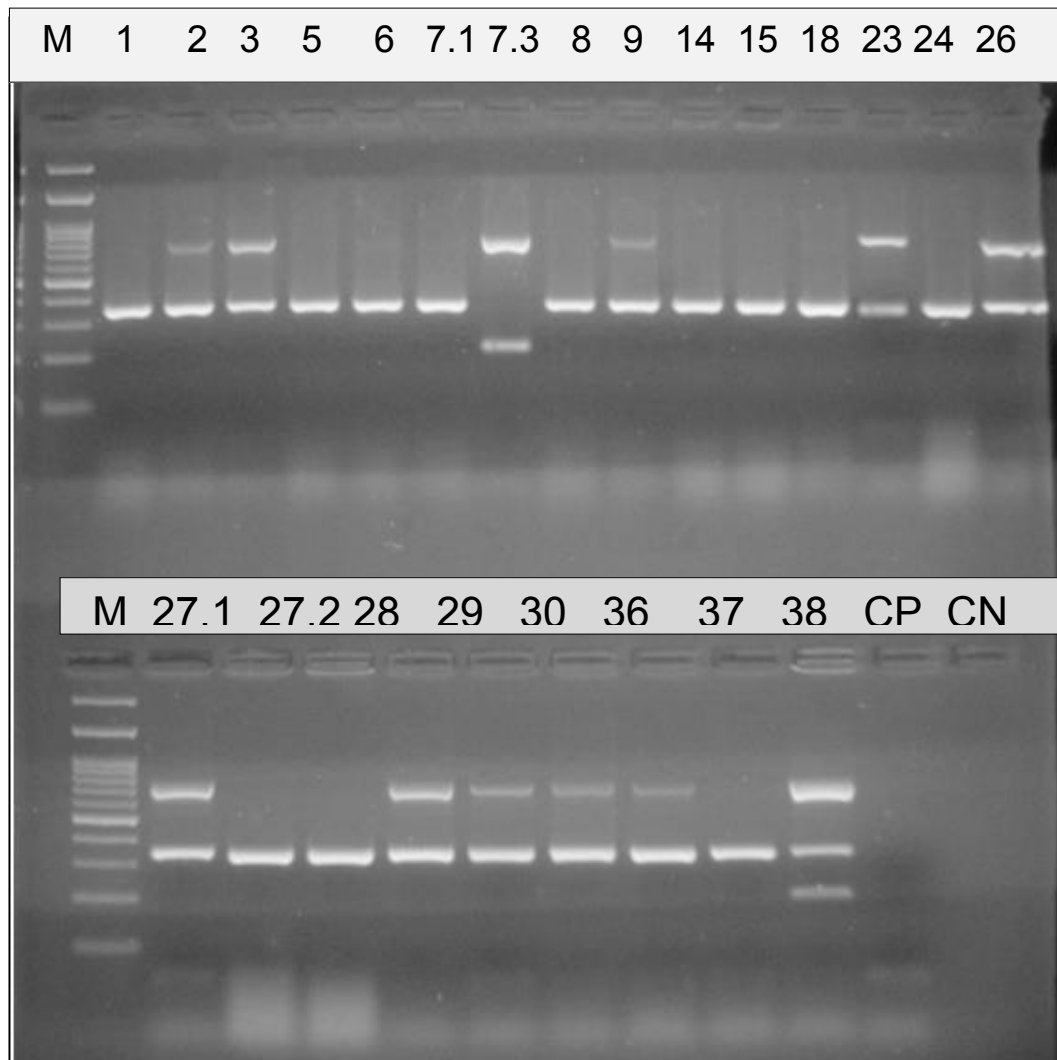


Figura 6 - Coleta de *Enterococcus spp.* de canais radiculares em meio seletivo Enterococcus Ágar com colônias sugestivas de: a) *E. faecalis*; b) *E. faecium*

Quadro 1- Identificação fenotípica e genotípica das culturas positivas para *Enterococcus* spp. coletadas dos canais radiculares com infecções endodônticas

Pacientes	API 20 STREP	PCR
1	97% <i>E. faecalis</i> 2% <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
2	86,8% <i>E. faecalis</i> 10,7% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
3	93% <i>E. faecalis</i> 3,5% <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
4.1	99,3% <i>E. faecalis</i> 0,2% <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
4.2	98% <i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
5	86,8% <i>E. faecalis</i> 10,7% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
6	- <i>Aerococcus viridans</i> - <i>Leuconostoc spp</i>	<i>E. faecalis</i>
7.1	- <i>E. faecalis</i> - <i>Aerococcus urinae</i> - <i>Streptococcus uberis</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>
7.3	73% <i>Enterococcus durans</i> 12.3% <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> 10.6% <i>Aerococcus viridans</i> 3.6% <i>Enterococcus faecium</i> 0.2% <i>Aerococcus urinae</i>	<i>E. faecium</i>
8	99,1% <i>E. faecalis</i> 0,6% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
9	72% <i>E. faecalis</i> 17,9% <i>Streptococcus uberis</i> 9,6% <i>E. faecium</i> 0,1% <i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>
14	86,8% <i>E. faecalis</i> 10,7% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
15	88,7% <i>E. faecalis</i> 5,4% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
18	48,3% <i>E. faecalis</i> 37,3% <i>E. faecium</i> 14% <i>Streptococcus uberis</i> 0,2% <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>E. faecalis</i>
23	86,8% <i>E. faecalis</i> 10,7% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
24	86,8% <i>E. faecalis</i> 10,7% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
25	- <i>Aerococcus viridans 1</i> - <i>E. faecium</i> - <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
26	99,1% <i>E. faecalis</i> 0,6% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
27	86,8% <i>E. faecalis</i> 10,7% <i>Streptococcus uberis</i>	<i>E. faecalis</i>
29	93,8% <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
30	97% <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
36	97,1% <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
37	97% <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
38	72% <i>E. faecalis</i> 17,9% <i>Streptococcus uberis</i> 9,6% <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>



PARTE SUPERIOR: **Can. 1-** M- marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; **Can. 2-** amostra 1; **Can. 3-** amostra 2; **Can. 4-** amostra 3; **Can. 5-** amostra 5; **Can. 6-** amostra 6; **Can. 7-** amostra 7.1; **Can. 8-** amostra 7.3 (*E. faecium*); **Can. 9-** amostra 8; **Can. 10-** amostra 9; **Can. 11-** amostra 14; **Can. 12-** amostra 15; **Can. 13-** amostra 18, **Can. 14-** amostra 23; **Can. 15-** amostra 24, **Can. 16-** amostra 26.

PARTE INFERIOR: **Can. 1-** M- marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; **Can. 2** amostra 27.1; **Can. 3-** amostra 27.2; **Can. 4-** amostra 28; **Can. 5-** amostra 29; **Can. 6-** amostra 30; **Can. 7-** amostra 36; **Can. 8-** amostra 37; **Can. 9-** amostra 38; **Can. 9-** Controle positivo (Multiplex); **Can. 10-** Branco (Controle negativo).

Figura 7 - Gel de agarose, á 2% em TBE, corado por brometo de etídio e visualizado no transluminador. Amostras clínicas de 1 a 38 foram identificadas como *E. faecalis*, exceto amostra 7.3 identificada como *E. faecium*.

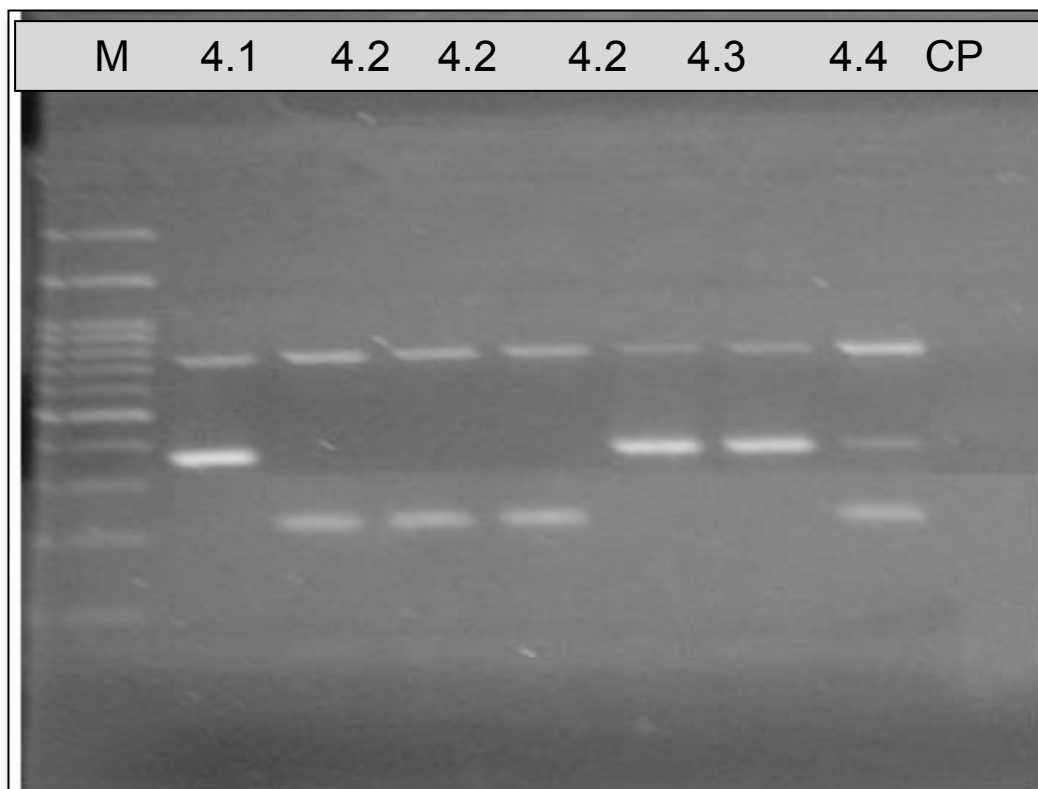


Figura 8 - Gel de agarose, á 2% em TBE, corado por brometo de etídio e visualizado no transluminador. Amostras clínicas 4.1, 4.3, 4.4 foram identificadas como *E. faecalis* e 4.2 (triplicata) identificada como *E. faecium*.

Can 1- M- marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; **Can. 2-** Variante 4.1; **Can. 3, 4 e 5-** Variante 4.2; **Can. 6-** Variante 4.3; **Can. 7-** Variante 4.4; **Can. 8-** Controle positivo (Multiplex); **Can. 9-** Branco (Controle negativo).

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os isolados, assim como as cepas padrão, foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antibióticos como amoxicilina (AC), amoxicilina + ácido clavulânico (XL), eritromicina (EM), azitromicina (AZ), tetraciclina (TC), ciprofloxacina (CI) e vancomicina (VA) por meio do método E-test. Foram encontrados 6 isolados (27%) de *E. faecalis* resistentes aos antibióticos, sendo pertencentes aos isolados de número

3 (resistente à tetraciclina), 4.1 (resistente à tetraciclina), 6 (resistente à azitromicina), 9 (resistente à ciprofloxacina), 15 (resistente à ciprofloxacina) e 18 (resistente à tetraciclina). A cepa padrão de *E. faecalis* exibiu resistência à ciprofloxacina. O isolado de *E. faecium* não apresentou resistência aos antibióticos, porém, para eritromicina e azitromicina obteve sensibilidade intermediária, assim como a cepa padrão dessa mesma espécie. Não foi encontrada resistência à vancomicina entre os isolados testados, mas 7 isolados de *E. faecalis* apresentaram sensibilidade intermediária à esse antibiótico (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2- Classificação da sensibilidade aos antibióticos e valores de MIC (mg/mL) para as cepas padrão de *E. faecalis* e *E. faecium*

Cepa padrão	AC	XL	EM	AZ	TC	CI	VA
<i>E. faecalis</i>	S 1	S 0,38	S 0,19	S 0,032	S 0,094	R 6	S 3
<i>E. faecium</i>	S 1	S 1,5	I 3	I 12	S 1	S 0,38	S 0,75

S = Sensível, I = Intermediário, R = Resistente

AC = amoxicilina, XL = amoxicilina + ácido clavulânico, EM = eritromicina

AZ = azitromicina, TC = tetraciclina, CI = ciprofloxacina, VA = vancomicina

Tabela 3- Classificação da sensibilidade aos antibióticos e valores de MIC (mg/mL) para os isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* obtidos dos canais radiculares

Nº isolado	AC	XL	EM	AZ	TC	CI	VA
1	S 0,38	S 0,19	S 0,38	S 1,5	S 3	S 0,50	S 2
2	S 0,38	S 0,25	S 0,38	S 1	S 0,023	I 3	S 1
3	S 0,38	S 0,38	I 3	S 0,25	R 16	I 1,5	I 6
4.1	S 0,38	S 0,25	S 0,50	S 0,25	R 16	S 0,064	I 6
4.2	S 1	S 0,19	I 6	I 3	S 0,125	S 0,25	S 1,5
5	S 0,38	S 0,064	S 0,38	S 0,19	I 5	I 1,5	S 2
6	S 0,50	S 0,50	I 3	R 8	S 0,38	S 0,75	S 1,5
7.1	S 0,47	S 0,094	I 0,75	S 1	I 12	S 0,25	S 1,5
7.3	S 0,50	S 0,38	S 0,047	S 0,032	S 0,25	S 0,75	S 1,0
8	S 0,50	S 1	I 1	I 3	S 0,75	S 1	S 2
9	S 0,75	S 0,38	S 0,38	S 0,19	I 6	R 5	S 2
14	S 0,75	S 0,50	I 0,75	S 1	S 0,125	I 1,5	I 24
15	S 0,38	S 0,75	I 1,5	S 0,125	S 0,38	R 4	I 24
18	S 0,38	S 0,50	I 1	S 0,25	R 24	S 0,75	S 1,5
23	S 1,5	S 0,64	S 0,50	S 0,50	S 0,125	S 1	S 3
24	S 0,19	S 2	I 0,75	S 1,5	I 12	S 0,38	S 2
25	S 0,19	S 0,19	S 0,50	S 0,25	S 0,25	S 0,50	S 1,5
26	S 0,38	S 0,50	I 0,75	S 1,5	I 12	S 0,50	S 3
27	S 0,25	S 0,50	S 0,50	S 1,5	S 0,25	S 0,50	S 1
29	S 0,16	S 0,25	I 1	S 1	S 0,94	S 0,50	S 3
30	S 0,38	S 0,19	I 1,5	S 2	S 0,047	S 1	I 6
36	S 0,38	S 0,125	I 1	S 1	S 0,94	S 0,75	I 8
37	S 0,19	S 0,32	S 0,50	S 0,75	S 0,47	S 0,75	I 6
38	S 0,25	S 0,25	I 1,5	S 2	S 0,125	S 0,50	S 4

S = Sensível, I = Intermediário, R = Resistente

AC = amoxicilina, XL = amoxicilina + ácido clavulânico, EM = eritromicina

AZ = azitromicina, TC = tetraciclina, CI = ciprofloxacina, VA = vancomicina

4.1= *E. faecalis*, 4.2= *E. faecium*.

5.3 Determinação da sensibilidade dos isolados à terapia fotodinâmica

Foram realizados testes de sensibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana, por meio da contagem de UFC/mL, para as cepas padrão de *E. faecalis* (Figura 9) e *E. faecium* (Figura 10), para as cepas clínicas de *E. faecalis* sensíveis (Figura 11) e resistentes (Figura 12) aos antibióticos, e para as duas cepas de *E. faecium* isoladas nesse trabalho (Figura 13).

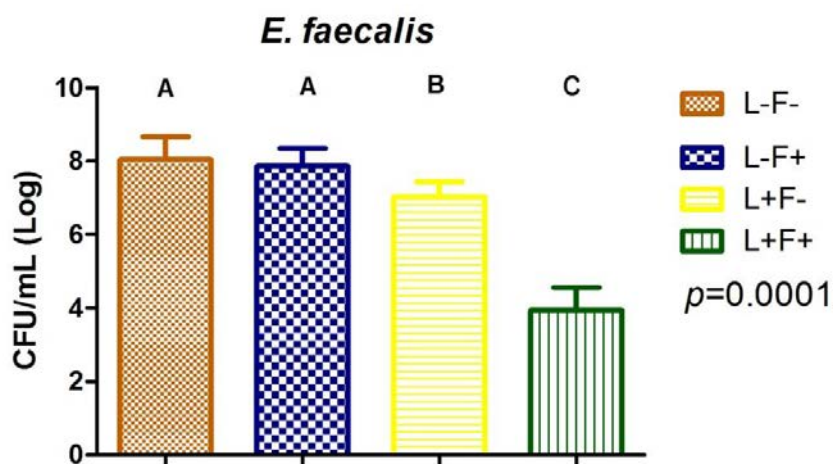


Figura 9 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem da cepa padrão de *E. faecalis* nos grupos: L-F- (Controle), L-F+ (apenas com fotossensibilizador), L+F- (apenas laser), e L+F+ (terapia fotodinâmica). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Teste de Tukey, $p<0,05$).

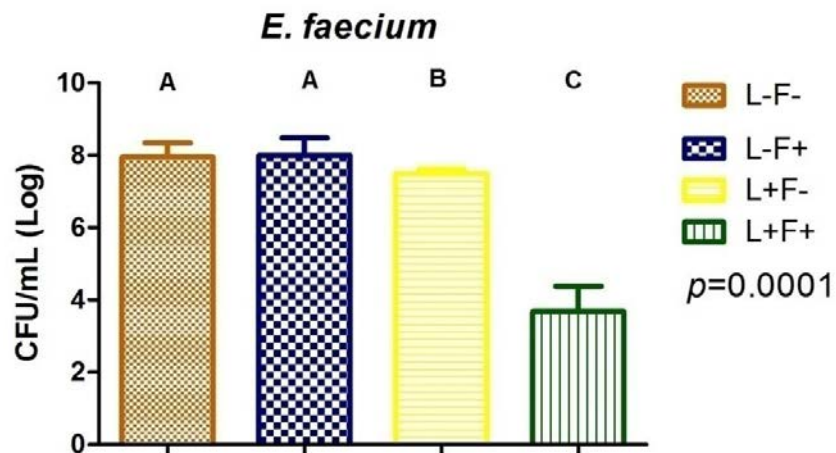


Figura 10 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem da cepa padrão *E. faecium* nos grupos: L-F- (Controle), L-F+ (apenas com fotossensibilizador), L+F- (apenas laser), e L+F+ (terapia fotodinâmica). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Teste de Tukey, $p<0,05$).

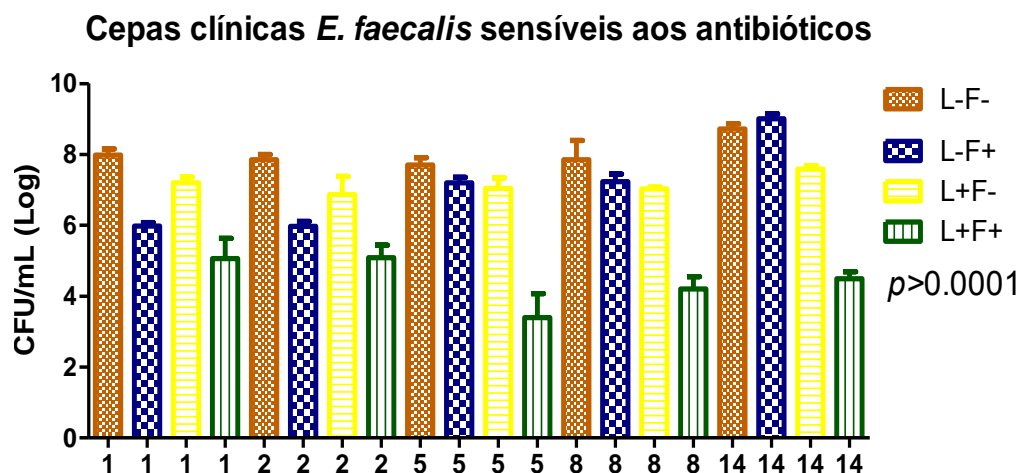


Figura 11 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das cepas clínicas de *E. faecalis* sensíveis aos antibióticos nos grupos: L-F- (Controle), L-F+ (apenas com fotossensibilizador), L+F- (apenas laser), e L+F+ (terapia fotodinâmica). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Teste de Tukey, $p<0,05$).

Cepas clínicas *E. faecalis* resistentes aos antibióticos

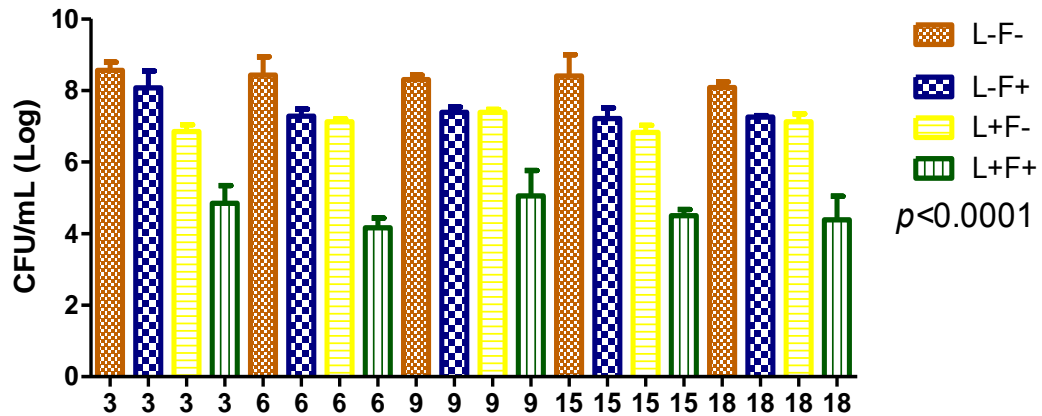


Figura 12 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das cepas clínicas de *E. faecalis* resistentes aos antibióticos nos grupos: L-F- (Controle), L-F+ (apenas com fotossensibilizador), L+F- (apenas laser), e L+F+ (terapia fotodinâmica).

Cepas clínicas *E. faecium* sensíveis

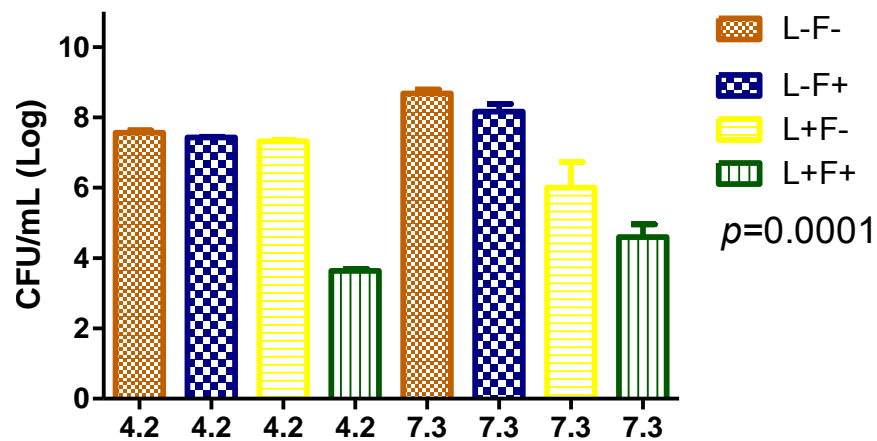


Figura 13 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem da cepa clílica de *E. faecium* sensível aos antibióticos nos grupos: L-F- (Controle), L-F+ (apenas com fotossensibilizador), L+F- (apenas laser), e L+F+ (terapia fotodinâmica). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Conforme pode ser observado nas Figuras 9 a 13, todas as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* testadas foram sensíveis à terapia fotodinâmica, com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle (L-F-) e tratado com PDT (L+F+). Todas as cepas clínicas de *E. faecalis* sensíveis e resistentes aos antibióticos convencionais apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade à PDT, entretanto as maiores reduções microbianas foram observadas no grupo de cepas sensíveis aos antibióticos convencionais (Tabelas 11 e 12). Em relação as cepas clínicas de *E. faecium* as 2 encontradas apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade à PDT (Tabela 13).

Tabela 11 - Média dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das 5 cepas clínicas de *E. faecalis* (isolados números 1, 2, 5, 8 e 14) sensíveis aos antibióticos nos grupos: L-F- (Controle) e L+F+ (terapia fotodinâmica)

Isolado	L-F-	L+F+	Redução em UFC(%)
1	100666667,00	190000,00	99,81
2	73666666,67	153333,33	99,79
5	54333333,33	5666,66	99,99
8	123666667,00	20000,00	99,98
14	686000,00	33333,33	95,15

Tabela 12 - Média dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das 5 cepas clínicas de *E. faecalis* (isolados números 3, 6, 9, 15 e 18) resistentes aos antibióticos nos grupos: L-F- (Controle) e L+F+ (terapia fotodinâmica)

Isolado	L-F-	L+F+	Redução em UFC(%)
3	393333333,33	100000,00	99,98
6	430000000,00	16666,66	99,99
9	206666666,67	266666,66	99,87
15	420000000,00	33333,33	99,99
18	125666667,00	53333,33	99,96

Tabela 13 - Média dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das 2 cepas clínicas de *E. faecium* (isolados números 4.2 e 7.3) sensíveis aos antibióticos nos grupos: L-F- (Controle) e L+F+ (terapia fotodinâmica).

Isolado	L-F-	L+F+	Redução em UFC(%)
4.2	36666666,70	4333,33	99,99
7.3	490000000,00	50000,00	99,99

5.4 Análise da virulência no modelo de *G. mellonella*

Foram realizadas análises da virulência no modelo de *G. mellonella* por meio da curva de sobrevivência para as cepas padrão de *E. faecalis* e *E. faecium* (Figura 14), para as cepas clínicas de *E. faecalis* sensíveis (Figura 15) e resistentes (Figura 16) aos antibióticos, e para as 2 cepas de *E. faecium* isoladas nesse trabalho (Figura 17) e da contagem de UFC/mL, que para as cepas clínicas de *E. faecalis* sensíveis (Figura 18) e resistentes (Figura 19) aos antibióticos, e para as 2 cepas de *E. faecium* isoladas nesse trabalho (Figura 20)

Curva de sobrevivência *E. faecalis* e *E. faecium* ATCC

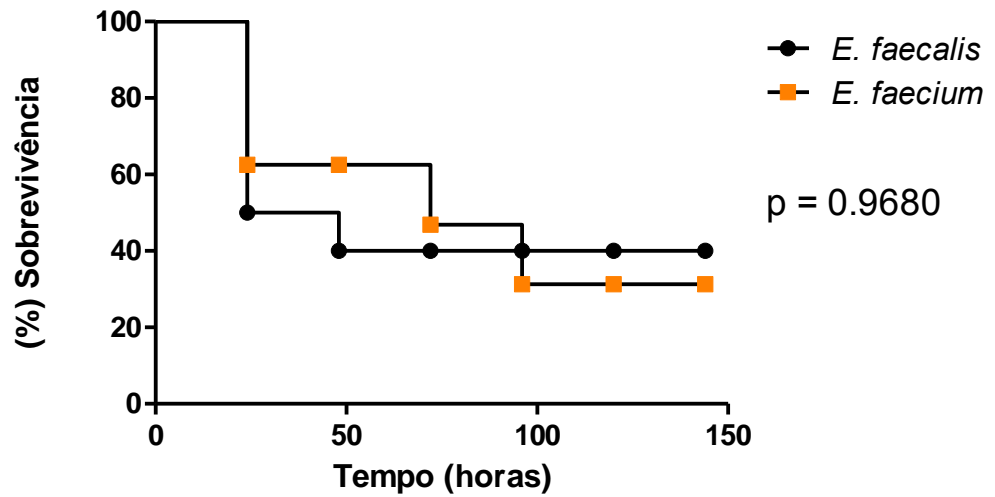


Figura 14 – Curva de sobrevivência das cepas padrão de *E. faecalis* e *E. faecium*, com N= 16 em *G. mellonella*.

Curva de sobrevivência *E. faecalis* sensíveis

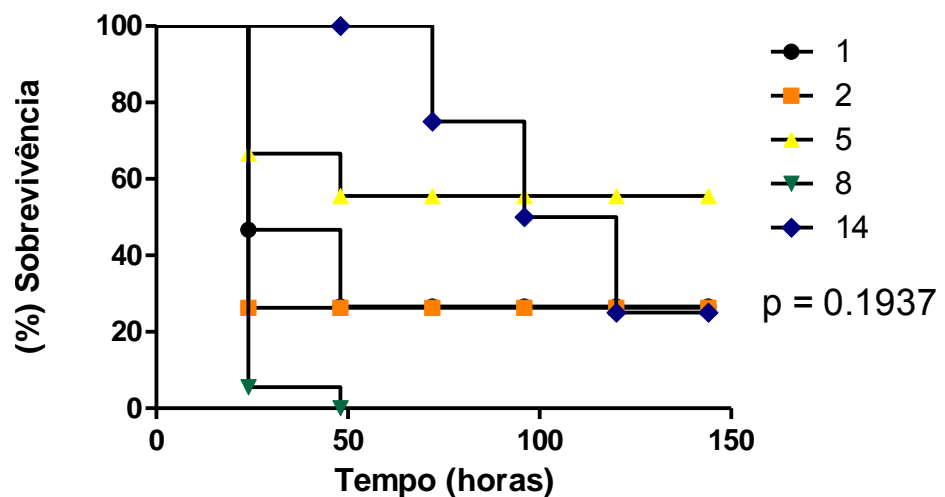


Figura 15 – Curva de sobrevivência das cepas *E. faecalis* sensíveis a alguns dos antibióticos testados, com N= 16 em *G. mellonella*.

Curva de sobrevivência *E. faecalis* resistentes

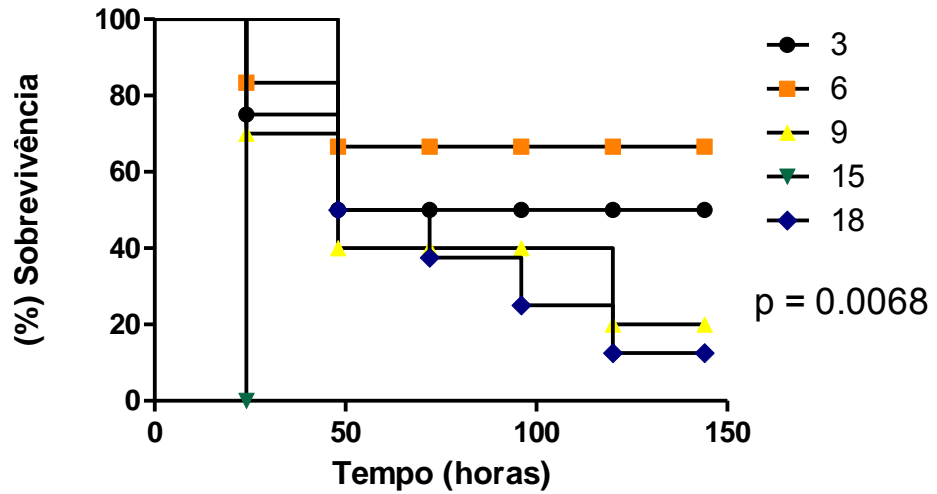


Figura 16 – Curva de sobrevivência das cepas *E. faecalis* resistentes a alguns dos antibióticos testados, com N= 16 em *G. mellonella*.

Curva de sobrevivência *E. faecium* sensíveis

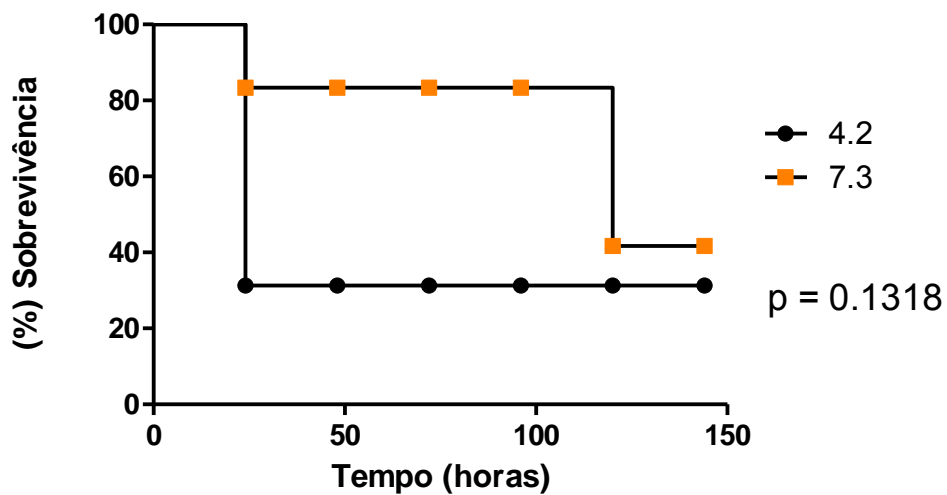


Figura 17 – Curva de sobrevivência das cepas *E. faecium* sensíveis a todos antibióticos testados, com N= 16 em *G. mellonella*.

Na análise de UFC/mL da hemolinfa da *G. mellonella*, houve uma concordância nos resultados em relação a curva de sobrevivência, como mostra no gráfico das cepas sensíveis de *E. faecalis* (Figura 18), cepas resistentes de *E. faecalis* (Figura 19) e cepas sensíveis de *E. faecium* (Figura 20).

Cepas de *E. faecalis* sensíveis aos antibióticos

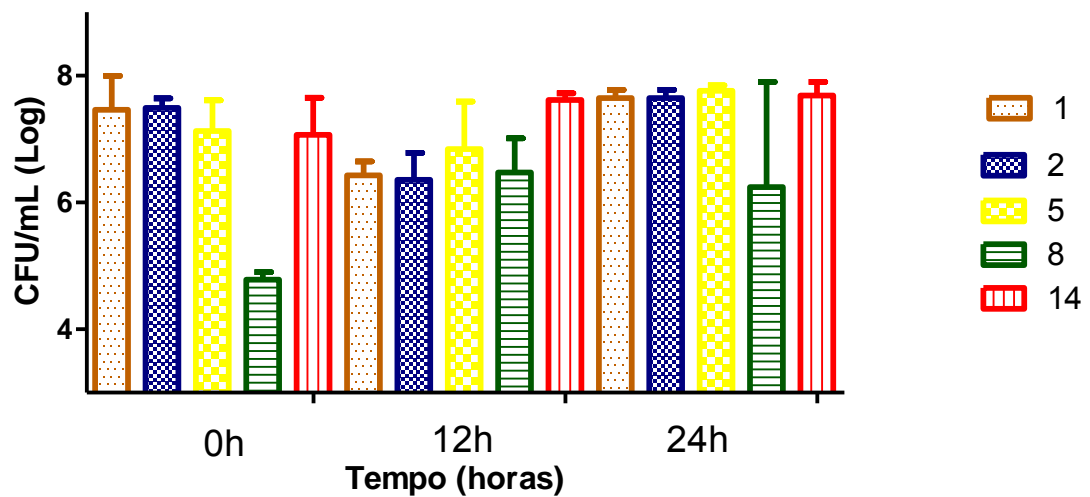


Figura 18 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das 5 cepas clínicas de *E. faecalis* (isolados números 1, 2, 5, 8 e 14) sensíveis aos antibióticos.

Cepas de *E. faecalis* resistentes aos antibióticos

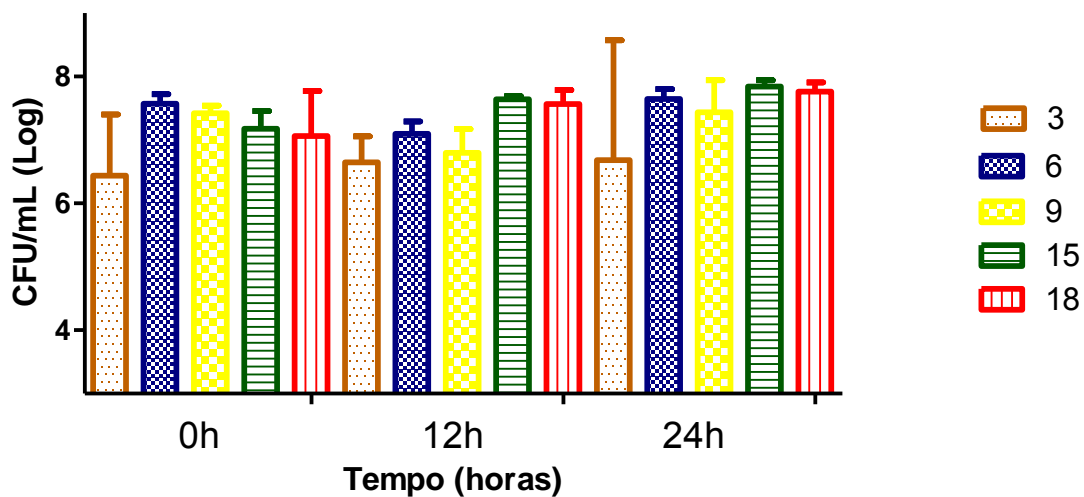


Figura 19 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das 5 cepas clínicas de *E. faecalis* (isolados números 3, 6, 9, 15 e 18) resistentes aos antibióticos.

Cepas de *E. faecium* sensíveis aos antibióticos.

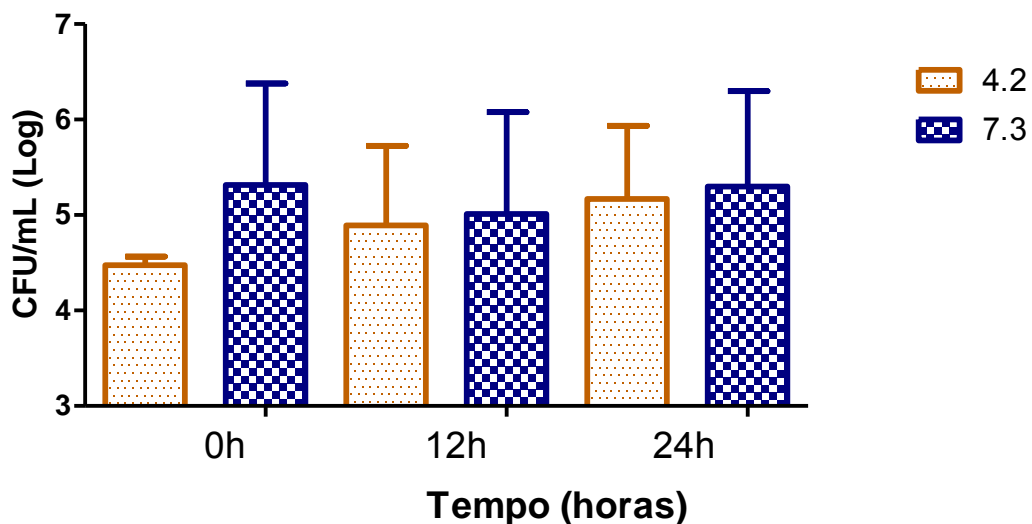


Figura 20 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) para contagem das 2 cepas clínicas de *E. faecalis* (isolados números 4.2 e 7.3) sensíveis aos antibióticos.

6 DISCUSSÃO

O gênero *Enterococcus* apresenta cerca de 12 espécies isoladas de seres humanos que são consideradas patogênicas, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies de maior relevância clínica em infecções hospitalares (Sreeja et al., 2012). Assim, o objetivo desse estudo foi isolar e identificar cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas e testar a sensibilidade desses isolados às terapias antimicrobianas e a virulência no modelo experimental de *G. mellonella*.

Em nosso estudo, o gênero *Enterococcus* foi encontrado em 58% dos canais radiculares analisados, concordando com dados da literatura, que demonstraram a alta prevalência desses micro-organismos em infecções endodônticas. Dunny *et al.* (2014) estudaram a microbiota presente em 54 dentes tratados endodonticamente e que apresentavam lesões periapicais persistentes. Houve crescimento bacteriano em 34 casos, sendo que a microbiota era composta predominantemente por uma ou duas espécies de micro-organismos Gram-positivos. Os gêneros mais isolados foram *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Streptococcus*.

Além disso, foi observado nesse estudo que todos os canais radiculares com cultura positiva para o gênero *Enterococcus* apresentavam a espécie *E. faecalis*, que é um micro-organismo Gram-positivo comumente detectado em infecções endodônticas assintomáticas persistentes. A sua prevalência nessas infecções varia entre 24 a 77% (Gomes et al., 2004; Garcez et al., 2013; Endo et al., 2013). Estes dados podem ser explicadas por diferentes fatores de sobrevivência e virulência encontrados em *E. faecalis*, incluindo a sua capacidade de competir com

outros micro-organismos, invadir túbulos dentinários, formar biofilme, e resistir à privação nutricional (Stuart et al., 2006).

Pinheiro (2004) relatou que *E. faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada dos canais radiculares com fracasso do tratamento endodôntico, estando presente em 52,9% dos canais com culturas positivas. Esses dados estão de acordo com os estudos prévios realizados por Molander et al. (1998), Sundqvist et al. (1998) e Hancock et al. (2001), que isolaram essa espécie bacteriana em, respectivamente, 47, 38 e 32% dos canais radiculares. Gomes et al. (2006) identificaram *E. faecalis* em 46,6% pelo método da cultura, e em 76% através da análise do DNA das mesmas amostras em casos de insucesso do tratamento endodôntico; confirmando que *E. faecalis* é encontrado numa frequência ainda maior em casos de insucesso do tratamento endodôntico quando métodos moleculares de identificação são utilizados.

A alta prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas pode ser atribuída a sua intensa capacidade de colonizar os sistemas de canais radiculares, utilizando-se dos substratos oriundos dos fluídos dos tecidos conjuntivos subjacentes (osso alveolar e ligamento periodontal). Também podem expressar alguns fatores de virulência, como enzimas citolíticas, substâncias de agregação e ácido lipoteicoico. Além disso, *E. faecalis* também pode interferir com a ativação dos linfócitos e outros grupos celulares, contribuindo para o insucesso da terapêutica endodôntica (Lee et al., 2004).

Apesar de muitos estudos anteriores terem sido realizados para isolar e identificar *E. faecalis* de infecções endodônticas, poucos estudos avaliaram a prevalência de *E. faecium* na cavidade bucal. No presente estudo, dos 22 canais radiculares com culturas positivas para o gênero *Enterococcus*, apenas 2 apresentaram a espécie *E. faecium*. Andrade et al. (2011) também avaliaram a prevalência de *Enterococcus spp.*

em 35 canais radiculares com necrose pulpar, encontrando 33 canais com *E. faecalis* e apenas 1 canal radicular com *E. faecium*.

Em nosso estudo, a identificação dos isolados foi realizada pelo sistema API 20 STREP e confirmadas pelo método de identificação molecular (PCR Multiplex). O método API 20 STREP apresentou resultados inconclusivos em 3 isolados de *Enterococcus*, que foram identificados na análise molecular pelo método PCR multiplex (Winston et al., 2004; Gomes et al., 2007). Gomes et al. (2007) identificaram 52 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras de alimentos empregando-se duas metodologias: sistema API 20 STREP e PCR multiplex. Os resultados obtidos revelaram que 78,9% dos isolados apresentaram resultados diferentes nos dois testes utilizados. Apenas 6 *E. faecalis* e 5 *E. faecium* apresentaram resultados concordantes pelos dois métodos. PCR multiplex permitiu a identificação completa de um número significativamente maior de *Enterococcus* do que o sistema API 20 STREP. A identificação de espécies de *Enterococcus* geralmente é feita pelo método fenotípico convencional e testes bioquímicos, porém, métodos moleculares estão se tornando os testes de escolha para identificação bacteriana (Chingwaru et al., 2003).

As espécies de *Enterococcus* tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao aumento de cepas resistentes aos vários antibióticos (Nes et al., 2014), incluindo eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, e, mais recentemente, vancomicina (Morrison et al., 1997; Shepard, Gilmore, 2002; Owens, 2008). Em nosso estudo, a análise da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada pelo método E-test, que é um método fácil de utilizar e interpretar, além de ser confiável para testar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias envolvidas em infecções endodônticas (Jacinto et al., 2008; Skucaite et al., 2010). Foram encontrados 6 isolados (27%) de *E. faecalis* resistentes aos antibióticos, sendo 3 resistentes à tetraciclina, 2 à ciprofloxacina e 1 à azitromicina. Os demais antibióticos, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico,

eritromicina e vancomicina possuíram 100% de eficácia contra as cepas estudadas. As duas cepas de *E. faecium* isoladas foram sensíveis a todos os antibióticos. Embora a emergência de cepas resistentes seja mais pronunciada em infecções hospitalares ou sistêmicas (Poeschl et al., 2010), estudos de cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de infecções endodônticas têm demonstrado o aparecimento de resistência bacteriana, principalmente ao regime terapêutico convencional utilizado em procedimentos odontológicos (Skucaite et al., 2010).

Lins et al. (2013) estudaram 20 isolados de *E. faecalis* de 43 pacientes com infecções endodônticas primárias. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada por disco-difusão em ágar, no qual todos os isolados foram considerados sensíveis à penicilina G, eritromicina e vancomicina. Os autores observaram ainda que *E. faecalis* apresentou resistência à tetraciclina, antibiótico comumente administrado para combater as infecções orais, concordando com os resultados do presente estudo.

Pinheiro (2003) encontrou 100% de susceptibilidade à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico das cepas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *A. viscosus* e *S. aureus*, sendo estes antimicrobianos os mais comumente utilizados na prática endodôntica. Esse resultado confirma a utilização da penicilina e seus derivados como antibióticos de primeira escolha no tratamento de infecções de origem endodôntica e como utilização na terapêutica profilática contra a endocardite bacteriana (Jacinto et al., 2008; Skucaite et al., 2010). Rams et al. (2013) encontraram 10,6% de resistência intermediária a ciprofloxacina nos isolados observados de *E. faecalis* e Pinheiro et al. (2003) comprovaram que *E. faecalis* foram susceptíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico e apresentaram resistência à eritromicina e azitromicina.

Na análise da sensibilidade das cepas de *Enterococcus* à terapia fotodinâmica, foi observado que a PDT causou redução de 3,7 a

4,1 \log_{10} para as cepas de *E. faecalis* e 3,9 a 4,2 para as cepas de *E. faecium* (cepas padrão e clínicas). A eficácia da PDT sobre cepas de *E. faecalis* já foi bastante estudada na literatura. Garcez et al. (2013) avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica em cepas de *E. faecalis*, utilizando azul de metileno em conjunto com laser de diodo a 660nm. Essas cepas foram inoculadas em canais radiculares de 10 dentes humanos durante 3 dias, e depois avaliadas pela microscopia eletrônica de varredura e imagens de bioluminescência. Foi encontrada uma redução de 88,7% no biofilme formado após a realização da terapia fotodinâmica. Esta terapia foi capaz de agir sobre as células, promovendo morte e alterações da membrana, e também sobre a matriz extracelular, desestruturando o biofilme.

Em relação à terapia fotodinâmica sobre *E. faecium*, existe apenas um único trabalho publicado na literatura, que foi desenvolvido recentemente por Chibebe et al. (2013). Esses autores testaram a eficácia da PDT no tratamento de infecções induzidas por *E. faecium* no modelo hospedeiro de larvas de *G. mellonella*. Foram testadas cepas de *E. faecium* sensíveis e resistentes à vancomicina, que foram isoladas do sangue ou de lesões de pacientes hospitalizados. Os resultados demonstraram que todas as cepas de *E. faecium* foram sensíveis à terapia fotodinâmica, entretanto as cepas resistentes à vancomicina foram menos suscetíveis à PDT.

Um dos aspectos mais promissores da PDT é que microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais podem ser mortos pelas espécies oxidantes geradas por excitação da luz. Nesse estudo, a PDT foi eficaz na inativação tanto das cepas de *E. faecalis* sensíveis aos antibióticos, quanto nas cepas resistentes, porém as maiores reduções microbianas foram alcançadas quando a PDT foi aplicada sobre as cepas sensíveis aos antibióticos convencionais. Esses dados sugerem o desenvolvimento de estudos adicionais para aumentar a eficácia da PDT

sobre cepas de micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais.

O uso de *G. mellonella*, como modelo de infecção experimental, está se tornando bastante frequente para o estudo da patogenicidade de micro-organismos. O nosso estudo mostrou que as bactérias *E. faecalis* e *E. faecium* foram capazes de estabelecer infecção letal nesse modelo hospedeiro. Entretanto, foi possível verificar que o grau de patogenicidade variou de acordo com as cepas testadas, tanto para a espécie *E. faecalis* como para a espécie *E. faecium*.

Esse resultado concorda com alguns trabalhos publicados na literatura. Laplante et. al. (2014) estudaram cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes ao antibiótico vancomicina no modelo de *G. mellonella*. Foi observado que as cepas números 5 e 8 mataram os animais infectados em 168 horas e a cepa 15 matou os animais infectados em 240 horas. Serror et. al. (2009) também verificaram que somente algumas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* foram virulentas para o modelo animal invertebrado de *G. mellonella*, confirmando a patogenicidade dependente das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que:

- O gênero *Enterococcus* foi encontrado em 58% dos canais radiculares com infecções endodônticas;
- Entre os canais radiculares com cultura positiva para o gênero *Enterococcus*, 100% apresentaram *E. faecalis* e dois canais radiculares apresentaram *E. faecium*;
- 27% dos isolados de *E. faecalis* foram resistentes aos antibióticos convencionais, incluindo tetraciclina, ciprofloxacina e azitromicina;
- As 2 cepas de *E. faecium* isoladas foram sensíveis a todos os antibióticos estudados;
- Não foram encontradas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina, mas os 7 isolados de *E. faecalis* apresentaram sensibilidade intermediária a esse antibiótico;
- A PDT foi eficaz para todas as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* testadas;
- Tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*, a virulência no modelo hospedeiro de *G. mellonella* foi dependente das cepas estudadas;

8 REFERÊNCIAS *

Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos JA. The collagen-binding Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun*. 2011;79:2277-84. doi:10.1128/IAI.00767-10. Epub 2011 Mar 21.

Al-Ahmad A, Tennert C, Karygianni L, Wrbas KT, Hellwig E, Altenburger MJ. Antimicrobial photodynamic therapy using visible light plus water-filtered infrared-A (wIRA). *J Med Microbiol*. 2013;62:467-73. doi:10.1099/jmm.0.048843-0. Epub 2012 Nov 22

Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2010;61-75. doi:10.1016/j.pdpdt.2010.02.001. Epub 2010 Apr 21.

Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect*. 2008;6:637-55. doi:10.1586/14787210.6.5.637.

Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:555-62. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x.

Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:266-78. doi:10.1038/nrmicro2761.

Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(9):1378-83. doi:10.1016/j.bbadis.2013.03.008. Epub 2013 Mar 19.

Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR et al. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol*. 2001;190(3):113-20.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bereket W, Hemalatha K, Getenet B, Wondwossen T, Solomon A, Zeynudin A, et al. Update on bacterial nosocomial infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci. Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;Aug;16(8):1039-44.

Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect.* 2006;8(8):2105-12.

Cotter G., Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; Feb;27(2):163-9.

Chibebe JJ, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AOC, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One.* 2013;8:e55926. doi:10.1371/journal.pone.0055926. Epub 2013 Feb 14.

Chingwaru W, Mpuchane SF, Gashe BA. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. *J Food Prot.* 2003 Jun;66(6):931-6.

Dahlén G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in *Enterococci* isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol.* 2012;4:10855. doi: 10.3402/jom.v4i0.10855. Epub 2012 Feb 22.

Delgado S, Mayo B. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *Int J Food Microbiol* 2004;90:309-19.

Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002451. doi: 10.1371/journal.ppat.1002451. Epub 2012 Feb 2.

Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses.* 2009;54:123-30.

Dunny GM, Hancock LE, Shankar N. Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Source Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. Feb 14.

Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy) J Med Microbiol. 2003;52:491-8.

Dworniczek E, Wojciech L, Sobieszczkańska B, Seniuk A. Virulence of *Enterococcus* isolates collected in lower silesia (Poland). Scand J Infect Dis. 2005;37(9):630-6.

Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. Eur J Dent. 2013 Jul;7(3):302-9. doi: 10.4103/1305-7456.115414.

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. Lasers Surg Med. 2007 Dec;39(10):782-7.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microb Infect. 2010;12:488-96. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.001. Epub 2010 Mar 9.

Gaspar F, Teixeira N, Rigottier-Gois L, Marujo P, Nielsen-LeRoux C, Crespo MT, Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. Microbiology. 2009 Nov;155(Pt 11):3564-71. doi: 10.1099/mic.0.030775-0. Epub 2009 Aug 20. doi: 10.1099/mic.0.030775-0. Epub 2009 Aug 20.

Garcez AS. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico. [dissertação] São Paulo. IPEN / Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

Garcez AS, Souza FR, Nuñez SC, Karther JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia - laser de baixa potência para redução microbiana. Rev APCD. 2003;57(3):223-6.

Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H, et al. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? Lasers Surg Med. 2013;28:79-85. doi: 10.1007/s10103-012-1073-8. Epub 2012 Mar 8.

Gomes ID, Araújo FG. Reproductive biology of two marine catfishes (Siluriformes, Ariidae) in the Sepetiba Bay, Brazil. *Rev Biol Trop*. 2004 Mar;52(1):143-56.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:996-1011.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3558-65.

Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod*. 2008 Dec;34(12):1451-6doi:10.1016/j.joen.2008.08.036. Epub 2008 Oct 19.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol*. 2011;11:247. doi:10.1186/1471-2180-11-247.

Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24:877-84. doi:10.1007/s10103-009-0673-4. Epub 2009 May 1.

Junqueira J C. Models hosts for the study of oral candidiasis. *Adv Exp Med Biol* 2012;71:95-105. doi:10.1007/978-1-4419-5638-5_10.

Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation and inhibits *Candida albicans* virulence factors reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):445.

Kense MJ, Landman WJM. *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *Avian Pathol*. 2011;40:603-12. doi:10.1080/03079457.2011.619165.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011;43:755-67. doi:10.1002/lsm.21080.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. J Dent Res. 2007;86(8):694-707.

Kopper. Neuroblastoma is a prototype of those malignancies which can progress very rapidly but can also be differentiated into a benign variant. In this issue. Pathol Oncol Res. 2007;13(4):267.

Kouidhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Hentati H, Bakhrouf A. Antibiotic resistance and adhesion properties of oral *Enterococci* associated to dental caries. BMC Microbiology. 2011;11:155. doi:10.1186/1471-2180-11-155.

Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. J Appl Microbiol. 2010;109:539-47. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x. Epub 2010 Jan 11.

Lee W, Lim S, Son H. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. J Endod. 2004;30:209-12.

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;34: 553-60.

Lins RX , de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MA, Williams DW, et. al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. J Dent. 2013 Sep;41(9):779-86. doi:10.1016/j.jdent.2013.07.004. Epub 2013 Jul 11.

Luther MK , Arvanitis M, Mylonakis E, LaPlante KL . Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using *Galleria mellonella* larvae. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Aug;58(8):4612-20. doi:10.1128/AAC.02790-13. Epub 2014 May 27.

Morison S , Dodge JA, Cole TJ, Lewis PA, Coles EC, Geddes D, et. al. Height and weight in cystic fibrosis: a cross sectional study. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee. Arch Dis Child. 1997 Dec;77(6):497-500.

Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, Auffray Y, Posteraro B, Gilmore MS, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2011;79:2638-45. doi:10.1128/IAI.01132-10. Epub 2011 May 2.

Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect Immun*. 2005;73:3833-41.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathol*. 2008;165:1-3.

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;72(6):3658-63.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31:1-7.

Nes IF, Diep DB, Ike Y. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014;16.

Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2000;26:221-4.

Nunes MR, Mello I, Franco GC, Medeiros JM, Santos SS, Habitante SM, et al. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2011;29:803-8.

Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence*. 2011;2:111-9.

Oriel S, Nitzan Y. Photoinactivation of *Candida albicans* by its own endogenous Porphyrins. *Curr Microbiol*. 2010;60:117-23. doi:10.1007/s00284-009-9514-8. Epub 2009 Oct 1.

Owens DK, Lohr KN, Atkins D, Treadwell JR, Reston JT, Bass EB, et. al. Grading the Strength of a Body of Evidence When Comparing Medical Interventions. Methods Guide for Effectiveness and Comparative Effectiveness Reviews [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008-.AHRQ Methods for Effective Health Care.2009 Aug 05.

Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in south america hospitals. J Clin Microbiology 2010;48:1562-9.

Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Quim Nova. 2007;30(4):988-94.

Poeschl EM, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Perineural invasion: correlation with aggressive phenotype and independent prognostic variable in both colon and rectum cancer. J Clin Oncol. 2010 Jul 20;28(21):e358-60; author reply e361-2. doi:10.1200/JCO.2009.27.3581. Epub 2010 Apr 12.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Micro-organisms from canals of root filled with periapical lesions. Int Endod J 2003;36:1-11.

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

Prakash VP, Rao SR, Parija SC. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. BMC Infect Dis. 2005;5:14.

Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. Candida albicans hyphal formation and virulence assessed using a Caenorhabditis elegans infection model. Eukaryot Cell. 2009;8:1750-8. doi:10.1128/EC.00163-09. Epub 2009 Aug 7.

Rams TE, Feik D, Mortensen JE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility of periodontal Enterococcus faecalis. J Periodontol. 2013 Jul;84(7):1026-33. doi:10.1902/jop.2012.120050. Epub 2012 Oct 29.

Ramsey AM, Zilberberg MD. Secular trends of hospitalization with vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in the United States. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30:184-6. doi:10.1086/593956.

Reeves AB, Pearce JM, Ramey AM, Meixell BW, Runstadler JA. Interspecies transmission and limited persistence of low pathogenic avian influenza genomes among Alaska dabbling ducks. *Infect Genet Evol.* 2011;11(8):2004-10.

Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of $[Ag_2(mal)(phen)_3]$. *Biometals.* 2009;22:461-7. doi:10.1007/s10534-008-9182-3. Epub 2008 Dec 12.

Santos SSF, Jorge AOC, Biofilme Dentário. In: Jorge, A.O.C. *Microbiologia e Imunologia Oral.* São Paulo: Ed. Elsevier, 2012;28:249-58.

Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod.* 2010 Oct;36(10):1611-6. doi:10.1016/j.joen.2010.04.009. Epub 2010 Jun 19.

Silbert T, Bird PS, Milburn GC, Walsh LJ. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. *J Dent Res.* 2000;79:569.

Silva CHV, Beatrice LCS, Aguiar CM, Correia AL, Cavalcanti RB. PCR and the microbiological profile of endodontic infections: reality or utopy?. *Odontologia Clin Cientif.* 2008;7:295-8.

Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006;32(10):979-84.

Souza LC, Brito PR, De Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010;36:292-6.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci.* 2010;25:385-9.

Sreeja S, Babu PRS, Prathab AG. The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res.* 2012 Nov;6(9):1486-8. doi:10.7860/JCDR/2012/4560.2539.

Stuart TE, Ding WW. When do scientists become entrepreneurs? The social structural antecedents of commercial activity in the academic life sciences. *AJS*. 2006 Jul;112(1):97-144.

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.

Teichert MC, Usacheva MN, Jones JW, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Feb;93(2):155-60.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. Lsa I the enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Oct;67(10):4538-45.

Walsh LJ. The current of laser applications in dentistry. *Aust Dent J*. 2003 Sep;48(3):146-55; quiz 198.

Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):872-900. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x. Epub 2011 Jul 4.

Willems RJ, Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol*. 2009 Nov;4(9):1125-35. doi:10.2217/fmb.09.82.

Winston CE, Rice DW, Bradshaw BJ, Lloyd D, Harris LT, Burford TI, et al. Science success, narrative theories of personality, and race self complexity: is race represented in the identity construction of African American adolescents? *New Dir Child Adolesc Dev*. 2004 Winter;(106):55-77.

Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiol*. 2011 Jan;34(1):73-80. Epub 2011 Jan 15.

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. doi:10.1016/j.joen.2010.08.053. Epub 2010 Oct 16.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética envolvendo seres humanos do ICT-CSJC-UNESP

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DAS CEPAS DE Enterococcus faecalis E Enterococcus faecium ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Pesquisador: Ana Carolina Chipoletti dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22490613.5.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 470.472

Data da Relatoria: 08/10/2013

Apresentação do Projeto:

E. faecium está se tornando um dos mais temidos micro-organismos em infecções hospitalares, por apresentar maior facilidade em adquirir resistência aos antibióticos do que *E. faecalis*. Entretanto, faltam estudos voltados para o isolamento e identificação de *E. faecium* na cavidade bucal. Os objetivos deste trabalho serão isolar e identificar cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas e comparar as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em relação à sensibilidade aos antibióticos convencionais e à terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT). Além disso, essas espécies serão comparadas quanto à virulência in vivo, utilizando o modelo de infecção experimental de *G. mellonella*. As cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de canais radiculares serão identificadas pelo sistema Rapid ID 32 Strep e PCR multiplex. Todos os isolados identificados como *E. faecalis* e *E. faecium*, serão testadas quanto à sensibilidade aos antibióticos pelo método E-test para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Serão testados os seguintes antibióticos de uso clínico: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, tetraciclina e ciprofloxacina. O antibiótico vancomicina também será incluído com o objetivo de identificar cepas resistentes à vancomicina (VRE) na cavidade bucal. A seguir, serão selecionadas algumas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* sensíveis e resistentes aos antibióticos convencionais para testes de sensibilidade in vitro à terapia fotodinâmica antimicrobiana. Cada

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 470.472

cepa será submetida a 4 condições experimentais: Fotossensibilizador e Laser (F+L+), Solução fisiológica e Laser (F-L+), Fotossensibilizador sem Laser (F+L-) e Solução fisiológica sem Laser como grupo controle (F-L-). A seguir, serão realizados dois ensaios experimentais: 1) diluições seriadas e semeaduras em ágar Infuso Cérebro-Coração para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), e 2) semeadura em Caldo Infuso Cérebro Coração para avaliação da viabilidade das culturas e determinação do efeito bactericida tardio da PDT. A virulência das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* serão testadas in vivo no modelo de infecção experimental de *G. mellonella* por meio da análise da curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* e por estudos de cultura de tecido para quantificação de UFC/mL de células bacterianas presentes na hemolinfa desses animais. Os dados de UFC/mL obtidos na terapia fotodinâmica e na infecção em *G. mellonella* serão submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* serão analisados pelo método de Log-rank. Em todos os testes, será considerado nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo desse estudo será isolar e identificar cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas e testar esses isolados quanto à sensibilidade as terapias antimicrobianas e à virulência no modelo hospedeiro de *G. mellonella*.

Objetivo Secundário:

- Isolar e Identificar cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em canais radiculares com infecções endodônticas; -
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antibióticos convencionais para diferentes isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*;
- Avaliar a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT) sobre *E. faecalis* e *E. faecium*, comparando isolados sensíveis e resistentes aos antibióticos convencionais em relação a sensibilidade à PDT;
- Analisar a virulência das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* no modelo de infecção experimental de *G. mellonella* por meio da curva de sobrevivência e cultura de tecidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As coletas microbiológicas não oferecem riscos aos pacientes.

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 470.472

Benefícios:

O conhecimento sobre os micro-organismos presentes nas infecções endodônticas, bem como o perfil de sensibilidade dos mesmos aos antibióticos é fundamental para o sucesso do tratamento dessas infecções. Além disso, o desenvolvimento de novas terapias, como a terapia fotodinâmica antimicrobiana, é importante para o controle de micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Seleção dos pacientes: Os pacientes serão selecionados por especialistas da Clínica de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José dos Campos. Serão selecionados 30 a 50 dentes para realização da coleta microbiológica (dentes anteriores ou pré-molares) que apresentarem integridade do elemento ou presença de selamento com material restaurador, ausência de bolsas periodontais com profundidade maior que 4 mm devido à possibilidade da lesão endo-periodontal, e possibilidade de realização de isolamento absoluto adequado. No dia da abertura coronária para o tratamento endodôntico, será feito a

2004). A importância clínica de infecções endodônticas por *Enterococcus* tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de identificar, controlar e tratar a sua ocorrência. No entanto, essas espécies bacterianas são de difícil cultivo e identificação dentro das técnicas de diagnóstico convencionais, o que pode dificultar ou mesmo impossibilitar sua detecção, podendo conduzir a uma estimativa errônea referente ao papel de determinadas espécies bacterianas envolvidas na infecção do sistema de canais radiculares (Silva et al., 2008). Nesse contexto, surgem os métodos baseados na análise de DNA bacteriano, que têm sido aplicados com sucesso (Delgado et al., 2004). A identificação ao nível de espécie, utilizando PCR com iniciadores específicos é um método valioso e pode substituir os testes microbiológicos convencionais que são de outro modo necessários para identificar as espécies utilizando abordagens fenotípicas (Jackson et al., 2004). PCR multiplex com primers específicos é uma ferramenta molecular simples que permite a identificação rápida e precisa de *Enterococcus* (Layton et al., 2010; Castillo-Rojas et al., 2013). O aumento da resistência das bactérias aos antibióticos tem emergido como um dos mais importantes desafios clínicos deste século, destacando a necessidade no desenvolvimento de tratamentos antimicrobianos alternativos, como a terapia fotodinâmica (PDT) (Oriol e Nitzan, 2010). Esta terapia consiste na associação de um fotossensibilizador exógeno e uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, iniciando uma reação celular fotoquímica que causa danos oxidativos às células de organismos procarióticos e eucarióticos (Souza et al., 2010). A PDT possui

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 470.472

várias características favoráveis para o tratamento de infecções originadas por micro-organismos patogênicos, incluindo um amplo espectro de ação, inativação eficiente de cepas resistentes aos antibióticos e baixo potencial mutagênico (Junqueira et al., 2009; Dovigo et al. 2009). Na literatura existem vários estudos sobre a aplicação da terapia fotodinâmica em cepas de *E. faecalis* (Foshi et al. 2007; Souza et al. 2010; Nunes et al. 2011, Garcez et al. 2013). Garcez et al. (2013) estudaram a terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDT), utilizando uma fibra difusora óptica, para o tratamento de infecções endodônticas. Foram utilizados 50 dentes recém-extraídos, que após esterilizados, foram contaminados com *E. faecalis* durante três dias. Amostras microbiológicas do canal foram feitas antes e depois do tratamento endodôntico com PDT. Os resultados demonstraram redução de 85 a 99% desse micro-organismo no canal radicular, sugerindo que a utilização da PDT no tratamento endodôntico é de grande eficácia para o controle de *E. faecalis*. Em relação à aplicação da terapia fotodinâmica sobre *E. faecium*, existe apenas um único trabalho publicado na literatura, que foi desenvolvido recentemente por Chibebe et al. (2013). Esses autores testaram a eficácia da PDT no tratamento de infecções induzidas por *E. faecium* no modelo hospedeiro de larvas de *G. mellonella*. Foram testadas cepas de *E. faecium* sensíveis e resistentes à vancomicina, que foram isoladas do sangue ou de lesões de pacientes hospitalizados. Os resultados demonstraram que as cepas de *E. faecium* foram sensíveis à terapia fotodinâmica, entretanto as cepas resistentes à vancomicina foram menos susceptíveis à terapia fotodinâmica. Atualmente, o modelo invertebrado de infecção experimental de *G. mellonella* tem sido considerado um método inovador e muito promissor para o estudo da virulência de patógenos microbianos. Até o momento, modelos in vivo para o estudo de infecções microbianas eram escassos e restritos a ratos e camundongos. Nos últimos anos, modelos de infecção em invertebrados foram desenvolvidos por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo, facilidade de manuseio, possibilidade de trabalho em grande escala e por não envolverem questões éticas. Entre os vários modelos de invertebrados podemos citar a ameba *Acanthamoeba castellanii*, o nemátodo *Caenorhabditis elegans* e os insetos *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* (Cotter et al. 2000, Pukkila-Worley et al. 2009, Rowan et al. 2009, Fuchs et al. 2010, Junqueira 2012). *Galleria mellonella* tem sido utilizada com sucesso como modelo para a patogênese microbiana porque apresenta tamanho suficiente (aproximadamente 5 cm de comprimento) para injeção de um inóculo padronizado de *C. albicans* ou de medicamentos antifúngicos. Além disso, as lagartas de *G. mellonella* apresentam hemolinfa com vários tipos de hemócitos, que possuem um papel importante na defesa contra patógenos. Em relação aos outros modelos de invertebrados, *G. mellonella* apresenta a vantagem de poder ser

Endereço: Av. Eng^o Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 470.472

mantida em temperaturas entre 25 a 37°C, aproximando-se das condições de temperatura em que os fungos são encontrados na natureza ou no hospedeiro. (Mylonakis & Aballay 2005, Chamillos et al. 2007, Fuchs & Mylonakis 2006, Mylonakis 2008, Fuchs et al. 2010). *G. mellonella* tem sido usada com sucesso para estudar a patogênese da infecção de vários patógenos, incluindo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* (Fuchs et al. 2010, Abranches et al. 2011, Olsen et al. 2011, Junqueira et al. 2011). Sendo assim, o objetivo desse trabalho será verificar a prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* em infecções endodônticas, bem como comparar os isolados de *E. faecalis* com os isolados de *E. faecium* em relação à sensibilidade às terapias antimicrobianas e à virulência no modelo de infecção experimental em *G. mellonella*.

Tamanho da Amostra no Brasil: 50

profilaxia no elemento alvo e bochecho com solução de gluconato de clorexidina (0,12%) durante um minuto, após o isolamento absoluto será realizada a anti-sepsia do dente e ao redor dele com Peróxido de hidrogênio á 30%, Hipoclorito de sódio á 2,5% e Tiosulfato de sódio á 5%, por 30 segundos cada um separadamente. Coleta microbiológica das amostras do canal radicular: Após a abertura coronária e a exposição do tecido pulpar, as amostras serão coletadas com o auxílio de 4 cones de papel absorventes esterilizados e de numeração compatível com o canal radicular (Endpoints Ind. Com. Ltda., RJ), os quais serão introduzidos no canal radicular até o comprimento pré-odontométrico (estabelecido na odontometria), permanecendo por 60 segundos. Em seguida os quatro cones serão transferidos para tubos contendo 3 mL do meio de solução salina tamponada (PBS, pH 7,2), e assim, transportados para o laboratório de microbiologia. Isolamento das amostras: As amostras serão homogeneizadas em vortex por 60 segundos e diluídas em solução salina tamponada. Aliquotas de 0,1 mL de diluições pré-estabelecidas serão transferidas e semeadas em duplicata, em placas contendo meio seletivo para *Enterococcus* (m-Enterococcus agar). As placas inoculadas serão incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, colônias sugestivas de *E. faecalis* e *E. faecium* pela morfologia e coloração de Gram, serão semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Infuso Cérebro-Coração Inclinado (Difco, Detroit, EUA) para realização dos testes de identificação fenotípica. Além disso, para a confirmação por identificação molecular, essas cepas serão semeadas em Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI) e estocadas a -80°C. Identificação das amostras: A identificação fenotípica será realizada pelo sistema Rapid ID 32 Strep (Bio Merieux, França) seguindo as recomendações do fabricante. As cepas identificadas como *E. faecalis* e *E. faecium* serão confirmadas pelo método de identificação

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 470.472

molecular (PCR Multiplex). Após o plaqueamento em meio seletivo para *Enterococcus*, as colônias serão dissolvidas em 180 µL do tampão de lise contendo 20 mg/mL lisozima, 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA e 1,2% Triton X-100, e posteriormente, incubadas a 37°C por 30 minutos. O DNA cromossômico será extraído pelo QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) conforme recomendações do fabricante, e sua quantificação realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ND-800, Thermo Scientific). O método de PCR Multiplex será utilizado para identificar e diferenciar as espécies de *E. faecalis* e *E. faecium* conforme descrito por Layton et al. (2010).

Critério de Inclusão: Serão incluídos no estudo, pacientes adultos com mais de 21 anos de idade, sem distinção de sexo ou raça e apresentando no arco dentário pelo menos um elemento dentário com indícios clínicos e radiográficos de necessidade de tratamento endodôntico. Os pacientes selecionados serão submetidos a uma anamnese e exames clínicos adequados, além de uma completa avaliação radiográfica bucal panorâmica e periapical.

Critério de Exclusão: Os pacientes serão excluídos se apresentarem qualquer patologia que contra-indique o tratamento endodôntico ou se utilizarem medicação antibiótica por pelo menos três meses antes do procedimento endodôntico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Avaliamos que o TCLE é de fácil compreensão para o participante de pesquisa.

Recomendações:

Não apresentamos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Avaliamos que o projeto apresentado traz as informações necessárias para elucidar seu desenvolvimento. Além do mais não oferece riscos aos participantes da pesquisa, pois, apenas será colhido material. Portanto, concluímos que a pesquisa é relevante pela grande incidência dos micro-organismos citados, podendo contribuir com melhoria do tratamento.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do relator.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 470.472

SAO JOSE DOS CAMPOS, 27 de Novembro de 2013

Assinador por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, ANA CAROLINA CHIPOLETTI DOS SANTOS, aluna de mestrado do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos / UNESP, portadora do CPF 367.548.848-94, estabelecida à Rua Suíça, nº 2240, na cidade de Pindamonhangaba-SP, telefone para contato nº (12) 91467472, vou realizar uma pesquisa cujo título é “PREVALÊNCIA, VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE ÀS TERAPIAS ANTIMICROBIANAS DAS CEPAS DE *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium* ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS”.

Os objetivos desse trabalho serão isolar e identificar micro-organismos presentes nos canais radiculares e estudar a resposta desses micro-organismos aos tratamentos convencionais e aos tratamentos mais modernos, como a terapia fotodinâmica. Além disso, será estudada também a capacidade desses micro-organismos em causar doenças.

Para realização desse estudo, serão coletadas amostras do canal radicular com cones de papel absorvente. Essas amostras serão transportadas para o Laboratório de Microbiologia, onde serão realizadas todas as etapas do estudo proposto. O Sr.(a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos / UNESP, situado na Av. Eng. Francisco José Longo, nº 777, Jardim São Dimas, CEP: 12245-000 - São José dos Campos-SP, Telefone: (12) 3947-9000 Fax: (12) 3947-9010. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG: _____ CPF: _____

Endereço: _____

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE A - Ficha clínica do paciente

Nome: _____

Número do dente: _____

Gênero: () Masculino () Feminino

Data de Nascimento: ___/___/_____

Data da Coleta da Amostra: ___/___/_____

Infecção: () primária () recidiva

Início do Tratamento: ___/___/_____

Vitalidade pulpar: () Polpa viva () Polpa morta

Lesão periapical: () sim () não

Exudato: () sim () não

Fístula: () sim () não

Dor: () sim () não