



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

ANA CAROLINA CHIPOLETTI DOS SANTOS

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONOTÍPICOS E HETEROTÍPICOS
POR *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium* EM DENTINA
RADICULAR**

2018

ANA CAROLINA CHIPOLETTI DOS SANTOS

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES MONOTÍPICOS E HETEROTÍPICOS POR
Enterococcus faecalis E *Enterococcus faecium* EM DENTINA RADICULAR**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Ana Carolina Chipoletti

Formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos por *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium* em dentina radicular / Ana Carolina Chipoletti Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
49 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. *Enterococcus faecium*. 3. Dentina Radicular. 4. Interações Microbianas. 5. Biofilme. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT)

Campus de São José dos Campos

Profa. Adjunta Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back-Brito

Fundação Vida Cristã (FAPI)

Faculdade de Odontologia

Campus de Pindamonhangaba

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT)

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Letícia Vargas Freire Martins Lemos

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 08 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido, **Leandro Prado Nunes da Silva**, pelo amor incondicional, me fornecendo total apoio e estrutura para que eu pudesse percorrer esse longo período com a tranquilidade e compreensão da minha ausência.*

*À minha mãe, **Telma Helena do Couto Chipoletti**, por todo esforço em sempre priorizar a melhor educação para que eu pudesse estudar nos melhores colégios e conseqüentemente conquistar a profissão de meus sonhos. Sem ela eu não teria conseguido.*

*Aos meus avós maternos, **Leny do Couto Chipoletti** e **João Chipoletti**, que foram à base de toda educação que minha mãe me deu, sempre me apoiando em todos os momentos da minha vida, sendo um exemplo de trabalhadores, estudiosos e donos de um caráter sem igual.*

*À minha Tia, **Patrícia do Couto Chipoletti Esteves**, minha primeira orientadora, foi através dela que me despertou esse interesse pela parte científica, pois me ajudou a dar os primeiros passos na confecção e apresentação do meu TCC na faculdade, minha eterna incentivadora e torcedora.*

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.*

*À meu eterno Professor de Dentística, **José Chibebe Junior**, que foi responsável pela minha primeira entrada na UNESP, para que eu fizesse a parte experimental da minha Iniciação Científica, e também me mandou uma mensagem nas férias me avisando que tinha aberto a inscrição para o PROAC na UNESP, nunca vou me esquecer de todo seu carinho comigo.*

*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. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira e vice-coordenador Prof. Adj. Mauro Pedrine Santamaria, pelo apoio constante para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Doutorado concedida a mim (processo 164593/2015-2).

Ao Carlos Guedes e Michele Ramos dos Santos, pela paciência em nos ajudar quanto aos processos CNPq 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. Adj. 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 neste trabalho.

À Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis, que abriu as portas do laboratório de endodontia para eu pudesse realizar parte da minha Tese de Doutorado.

À Faculdade de Pindamonhangaba, pois sempre que precisei pude recorrer á vocês.

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

Aos secretários da Seção da Pós Graduação, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka 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.

À Patricia Pimentel de Barros que sempre esteve pronta a me ajudar desde meu Mestrado e agora na finalização do meu Doutorado. E também pela amizade e apoio que sempre foram de uma importância sem fim.

Aos amigos, Rodnei Denis Rossoni, Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, Rafaella Braga Santos e Mirian Marcolan de Mello, pelos momentos de descontração, amizade e ajuda imprescindível para conclusão dos experimentos.

À “minha” aluna de Iniciação Científica, Isabela Abrão Venturini Salomão, pela dedicação, disponibilidade, amizade e auxílio durante toda fase experimental. Sem você, seria impossível realizar todo esse trabalho.

À todos os colegas do laboratório, Jéssica Diane dos Santos, Janaína Araújo de Alvarenga, Livia Aparecida Procopio, Fernanda Freire, Elis Andrade de Lima Zutin, Nádia Domingues, Felipe de Camargo Ribeiro, Isabela Amendola, Lívia Mara Alves Figueiredo Godoi, Lucas de Paula Ramos, Marisol Veloso, Cassia Cestari Toia, Esteban Isai Flores Orozco 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.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 PROPOSIÇÃO.....	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Seleção das cepas.....	18
3.2 Formação dos biofilmes de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> em dentinas radiculares.....	19
3.2.1 Preparação das raízes de dentes bovinos.....	19
3.2.2 Formação dos biofilmes em dentinas radiculares.....	20
3.3 Análise dos biofilmes por contagem de UFC/mL.....	21
3.4 Análise do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	22
3.5 Quantificação do biofilme por meio da absorbância em cristal violeta.....	23
3.6 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Análise da formação dos biofilmes monotípicos pela contagem de UFC/mL.....	25
4.2 Análise dos biofilmes monotípicos através das imagens realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	27

4.3 Análise da formação dos biofilmes monotípicos e heterotípicos pela quantificação da biomassa total.....	33
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

Santos ACC. Formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos por *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium* em dentina radicular [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

E. faecalis e *E. faecium* possuem grande relevância nas infecções hospitalares por apresentarem facilidade em adquirir resistência aos antibióticos. *E. faecalis* também apresentam alta prevalência nas infecções endodônticas, entretanto a importância de *E. faecium* para a odontologia ainda precisa ser esclarecida. Assim, o objetivo desse estudo foi comparar cepas clínicas de *E. faecium* com as cepas de *E. faecalis* em relação a capacidade de formação de biofilme na dentina radicular e penetração nos túbulos dentinários. Além disso, foi avaliada a interação dessas espécies em biofilmes mistos. Para a realização desse estudo, foram utilizadas cepas clínicas, previamente, isoladas de canais radiculares com infecções endodônticas e identificadas pelo PCR multiplex. Entre as cepas isoladas, foram selecionadas 4 cepas de *E. faecalis* e 2 cepas de *E. faecium*. Primeiramente, foi realizado a formação dos biofilmes monotípicos das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* sobre dentinas radiculares de dentes bovinos. Os biofilmes foram formados em placas de microtitulação por diferentes tempos: 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os biofilmes formados foram, então, analisados pela contagem de células viáveis (UFC/mL) e quantificação da biomassa total (método do cristal violeta). Além disso, os biofilmes foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) procurando-se observar a penetração das células de *E. faecalis* e *E. faecium* nos túbulos dentinários. A seguir foram formados biofilmes heterotípicos de *E. faecalis* e *E. faecium* para estudo das interações ecológicas estabelecidas entre as espécies. A análise dos biofilmes heterotípicos foi feita pela quantificação da biomassa total (cristal violeta) procurando-se detectar a presença de relações sinérgicas ou antagônicas. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerando-se nível de 5%. Os resultados obtidos na contagem de UFC/mL dos biofilmes monotípicos, revelaram que as 6 cepas testadas apresentam grande capacidade para formar biofilmes na dentina radicular, alcançando valores de UFC/mL entre 8 a 12 log de acordo com o tempo de observação. Em relação a análise das imagens de MEV, as cepas clínicas de *E. faecalis* e *E. faecium* demonstraram capacidade semelhante para formar biofilmes e penetrar nos túbulos dentinários. Na comparação da quantificação da biomassa dos biofilmes monotípicos e heterotípicos, observamos que a interação das cepas clínicas *E. faecalis* e *E. faecium* favoreceu a adesão e crescimento do biofilme. Assim, concluiu-se que as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* apresentam a mesma capacidade de formar biofilmes sobre a superfície radicular. Além disso, em biofilmes mistos, essas duas espécies estabelecem relações ecológicas sinérgicas, aumentando significativamente a formação de biofilmes.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecium*. Dentina Radicular. Interações Microbianas. Biofilme.

Santos ACC. Formation of monotypic and heterotypic biofilm by *Enterococcus faecalis* E *Enterococcus faecium* in root dentin [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

E. faecalis and *E. faecium* have a high relevance in hospital infections because they are easy to acquire resistance to antibiotics. *E. faecalis* also present high prevalence in endodontic infections, however the importance of *E. faecium* for dentistry still needs to be clarified. Thus, the objective of this study was to compare clinical strains of *E. faecium* with strains of *E. faecalis* in relation to the capacity of biofilm formation in root dentin and penetration into the dentin tubules. In addition, the interaction of these species in mixed biofilms was evaluated. In order to perform this study, clinical strains were used, pre-determined, isolated from root canals with endodontic infections and identified by multiplex PCR. Among the isolated strains, 4 strains of *E. faecalis* and 2 strains of *E. faecium* were selected. Firstly, the formation of the monotypic biofilms of the strains of *E. faecalis* and *E. faecium* on root dentin of bovine teeth was carried out. The biofilms were formed in microtiter plates at different times: 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The biofilms formed were then analyzed by counting viable cells (CFU / mL) and quantification of total biomass (violet crystal method). In addition, the biofilms were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM), aiming to observe the penetration of *E. faecalis* and *E. faecium* cells into the dentin tubules. Then, heterophilic biofilms of *E. faecalis* and *E. faecium* were formed to study the ecological interactions established between the species. The analysis of the heterotypic biofilms was made by quantifying the total biomass (violet crystal) in order to detect the presence of synergistic or antagonistic relationships. The results were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey test, considering a level of 5%. The results obtained in the CFU / mL count of the monotypic biofilms revealed that the six strains tested had a great capacity to form biofilms in the root dentin, reaching values of CFU / mL between 8 and 12 log according to the time of observation. In relation to SEM images, the clinical strains of *E. faecalis* and *E. faecium* demonstrated similar capacity to form biofilms and to penetrate the dentinal tubules. In the comparison of the biomass quantification of the monotypic and heterotypic biofilms, we observed that the interaction of the clinical strains *E. faecalis* and *E. faecium* favored the adhesion and growth of the biofilm. Thus, it was concluded that strains of *E. faecalis* and *E. faecium* have the same ability to form biofilms on the root surface. In addition, in mixed biofilms, these two species establish synergistic ecological relationships, significantly increasing the formation of biofilms.

Keywords: *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecium*. Dentin Radicular. Microbial interactions. Biofilm.

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus constituem um gênero de bactérias amplamente distribuídas no meio ambiente, tais como solo, água, alimentos e plantas, podendo estar presente na microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis. Apesar de serem encontrados no trato gastrointestinal de seres humanos como micro-organismos comensais, também 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).

Esse gênero de bactérias é constituído por mais de 30 espécies, nas quais *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* correspondem à maioria dos isolados de infecções nosocomiais, sendo que as outras espécies deste gênero representam apenas 10% dos isolados. *E. faecium* e *E. faecalis*, estão frequentemente relacionados com bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites (Kense, Landman, 2011; Zou et al., 2011). Desse modo, *Enterococcus* representam o terceiro patógeno nosocomial mais prevalente em todo o mundo (Bereket et al., 2012).

A prevalência de *E. faecalis* e *E. faecium* passou por mudanças ao longo dos anos. *E. faecium* emergiu como um dos mais importantes patógenos em infecções associadas aos cuidados de saúde em todo o mundo devido à sua resistência intrínsecamente adquirida à vários antibióticos, incluindo a vancomicina. A capacidade intrínseca e a facilidade em adquirir resistência aos diversos antibióticos, faz com que *E. faecium* seja um dos mais temidos micro-organismos em infecções hospitalares (Panesso et al., 2010). As infecções causadas por *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes (VRE) são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados com comprometimento do sistema imunológico (Tang et al., 2016; Lewis et al., 2016; Tripathi et al., 2016).

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, essa nova fase está diretamente 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, posto que apresenta maior resistência à vancomicina e ampicilina do que *E. faecalis* (Arias, Murray, 2012).

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* vem tornando-se ao longo dos anos um patógeno tão comum em infecções hospitalares 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, Zilberberg, 2009), e atualmente a porcentagem de isolados resistentes à vancomicina corresponde a 80% das cepas de *E. faecium* enquanto 5% das cepas de *E. faecalis* (Arias, Murray, 2008; Hidron et al., 2008).

O gênero *Enterococcus* também apresenta grande relevância na odontologia, sendo *E. faecalis* a principal espécie relacionada com infecções endodônticas. 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*.

A presença de *Enterococcus* no interior de canais 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 intracanalais 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).

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). Esses micro-organismos também podem expressar alguns fatores de virulência, como enzimas citolíticas, substâncias de agregação e ácido lipoteicóico.

Silva et al. (2014) relataram que *E. faecalis* é capaz de sobreviver por longos períodos sem nutrientes e tem a capacidade de invadir túbulos dentinários que o protegem contra os agentes antimicrobianos usados na endodontia. Além disso, *E. faecalis* também pode interferir na resposta imune do hospedeiro, suprimindo-a com a inativação dos linfócitos e outros grupos celulares, contribuindo dessa forma para o insucesso da terapêutica endodôntica (Lee et al., 2004).

Além do gênero *Enterococcus* ser resistente ao tratamento endodôntico químico e mecânico, esse tem capacidade de formar biofilmes, dificultando a penetração dos medicamentos e reduzindo a eficácia dos mesmos. Os biofilmes são estruturas tridimensionais complexas de micro-organismos embebidos em uma matriz extracelular, composta por glicoproteínas e polissacarídeos, aderidas à uma superfície sólida (Zijngel et al., 2010; Jorge, 2012). Os biofilmes constituem importante sistema de adesão bacteriana com grande relevância clínica devido a sua alta resistência aos antimicrobianos (Thein et al., 2009; Zijngel et al., 2010). Albuquerque et al. (2015) demonstraram que *E. faecalis* possuem capacidade de se organizar em biofilme em dentinas radiculares de dentes humanos. Após cinco dias da indução de formação de biofilme, os micro-organismos formaram uma camada espessa de biofilme, sendo capazes de penetrar nos túbulos dentinários. Esses dados sugerem que a formação de biofilme em dentinas radiculares pode ter uma participação significativa nas infecções endodônticas.

A incapacidade da remoção de bactérias nos biofilmes radiculares representa um fator causador da doença pulpar e lesões perirradiculares. O sucesso do tratamento endodôntico depende principalmente da remoção bem sucedida de micro-organismos do sistema de canal radicular infectado. Yadav et al. (2017) avaliaram o efeito antibacteriano de quitosana 0,25%, quitosana 0,5%, clorexidina 2% e hipoclorito de sódio a 3% como agentes de desinfecção contra *Enterococcus faecalis*. Segundo Yadav et al. (2017), o tipo de antimicrobiano e as variações nas

concentrações químicas desses irrigantes também pode ter impacto diferente sobre a polpa, tecidos necróticos e micro-organismos. Hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado em tratamento endodôntico, tem uma boa capacidade de dissolução do tecido antimicrobiano e orgânico, mas é tóxico para os tecidos periapicais e enfraquece a dentina, reduzindo sua resistência à flexão e resiliência, tornando-a mais suscetível à deformação e possivelmente fraturas. A clorexidina tem sido sugerida como uma alternativa a NaOCl, sendo amplamente utilizada na odontologia como um enxaguante antimicrobiano em periodontia e como irrigante eficaz na endodontia, por mostrar um efeito antibacteriano residual prolongado e uma relativa ausência de toxicidade. Entretanto, seu uso como irrigante endodôntico deve ser restrito porque pode descolorir os dentes e também tem pouca capacidade de dissolução do tecido. Outros efeitos secundários incluem perda de sensação da mucosa oral, ressecamento subjetivo da cavidade oral e descoloração da língua. Para avaliar os efeitos antimicrobianos desses irrigantes na formação de biofilmes, esses autores colocaram cada irrigante separadamente em poços de placas de 24 poços contendo suspensão bacteriana e espécime de dentes bovinos. Neste estudo Clorexidina, NaOCl e quitosana nas concentrações testadas reduziram o biofilme com *Enterococcus faecalis* significativamente, mas a baixa toxicidade com quitosana nas duas concentrações favoreceu seu uso como irrigante do canal radicular como uma alternativa, considerando as várias propriedades indesejáveis de NaOCl e clorexidina.

Almaroof et al. (2017) realizaram um trabalho com o objetivo de desinfetar os canais radiculares antes do material obturador tomar presa, adicionando monômero EgMA a 20% em dois materiais adesivos utilizados para obturar o canal radicular. Esse trabalho foi realizado a partir de formação de biofilme de *E. faecalis* em raízes de dentes bovinos e avaliado quantitativamente através de difusão em agar, verificando halos de inibição em culturas positivas e também comprovando sua redução na comparação do antes e depois em imagens do MEV. Com isso concluiu-se que houve uma ação antimicrobiana do novo composto, sendo necessários mais estudos para comprovação dos resultados.

Bukhary e Balto. (2017) analisaram a eficácia de NaOCl 5,25%, alexidina 1% e clorexidina 2% sobre biofilmes de *E. faecalis* (ATCC 29212) formados em discos de dentina radicular de dentes humanos extraídos. Os biofilmes foram formados por

3 semanas, e após os tratamentos foram analisados por microscopia confocal procurando-se verificar a diferença na proporção do biofilme após o tratamento com cada irrigante. Na análise dos resultados, verificou-se que a maior redução na proporção de biofilme ocorreu no grupo NaOCl comparando com os outros grupos com alexidina e clorexidina.

Santos (2014) realizaram 38 coletas de canais radiculares de diferentes pacientes. As amostras positivas no agar *Enterococcus* foram submetidas à testes fenotípicos e genotípicos para identificação da espécie. Os isolados identificados como *E. faecium* e *E. faecalis* foram testados quanto à suscetibilidade à antibióticos pelo método E-test. Os isolados bacterianos, também, foram avaliados quanto à suscetibilidade à terapia fotodinâmica (PDT). Culturas positivas para *E. faecalis* foram encontradas em 22 pacientes (58%). Entre estes pacientes, apenas dois tinham *E. faecium* em infecções mistas com *E. faecalis*. Nos isolados de *E. faecalis*, 27% eram resistentes a antibióticos, incluindo tetraciclina, ciprofloxacina e azitromicina. Os isolados de *E. faecium* não apresentaram resistência aos antibióticos testados. Ambos os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* apresentam susceptibilidade significativa à PDT, incluindo os isolados resistentes aos antibióticos. *E. faecium* mostrou menor prevalência em infecções endodônticas e maior susceptibilidade a terapias antimicrobianas quando comparado a *E. faecalis*.

Esses trabalhos mostram a importância dos estudos com *Enterococcus spp.* na cavidade bucal, buscando-se entender a prevalência, formas de resistência aos agentes antimicrobianos, capacidade de formação de biofilmes e estabelecimento de relações ecológicas entre diferentes espécies do gênero. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de *E. faecalis* e *E. faecium* em formar biofilmes monotípicos e heterotípicos em dentinas radiculares.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse estudo foi comparar cepas clínicas de *E. faecium* com as cepas de *E. faecalis* em relação a capacidade de formação de biofilme na dentina radicular e penetração nos túbulos dentinários. Além disso, foi avaliada a interação dessas espécies em biofilmes mistos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a capacidade de diferentes cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em formar biofilme sobre dentinas radiculares por meio da contagem de UFC/mL;
- b) Realizar uma avaliação temporal do desenvolvimento dos biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium*;
- c) Observar a penetração de *E. faecalis* e *E. faecium* nos túbulos dentinários usando análises de microscopia eletrônica de varredura;
- d) Avaliar as interações entre *E. faecalis* e *E. faecium* nos biofilmes mistos por meio da quantificação de biomassa total usando coloração por cristal violeta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das cepas

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 (número: 45899415.3.0000.0077). Foram utilizadas 6 cepas clínicas, sendo 4 de *E. faecalis* e 2 de *E. faecium* isoladas de dentes com infecções endodônticas no trabalho de Santos (2014). As cepas identificadas estão isoladas e armazenadas em Eppendorf contendo 80% de BHI e 20% de glicerol, no freezer -80 °C, no laboratório de microbiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos-UNESP.

As cepas foram identificadas pelo método de PCR multiplex e avaliadas de acordo com a suscetibilidade antimicrobiana pelo E-test, testando-se os antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, tetraciclina, ciprofloxacina e vancomicina.

De acordo com o número de cepas de cada espécie isoladas no trabalho anterior e o perfil de resistência aos antibióticos, previamente testados, foram selecionadas 6 cepas clínicas para o presente estudo, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 - Cepas clínicas de *Enterococcus* utilizadas nesse estudo e perfil de sensibilidade aos antibióticos previamente testados (amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulônico, eritromicina, azitromicina, tetraciclina, ciprofloxacina e vancomicina)

Isolados clínicos	Perfil de sensibilidade aos antibióticos
<i>E. faecalis</i> 1	Sensível a todos os antibióticos
<i>E. faecalis</i> 2	Sensível a todos os antibióticos
<i>E. faecalis</i> 3	Resistente para tetraciclina
<i>E. faecalis</i> 6	Resistente para azitromicina
<i>E. faecium</i> 4.2	Sensível a todos os antibióticos
<i>E. faecium</i> 7.3	Sensível a todos os antibióticos

3.2 Formação dos biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* em dentinas radiculares

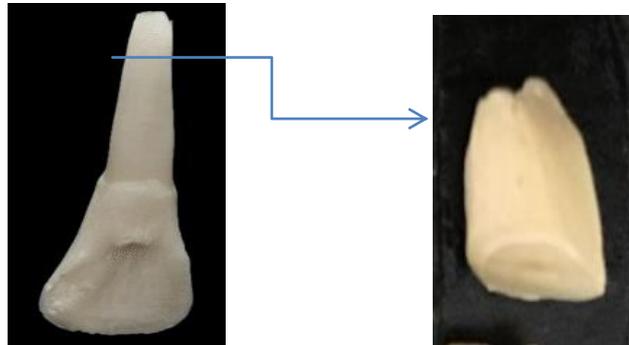
A metodologia de formação de biofilme foi realizada de acordo com Albuquerque et al. (2015), com algumas modificações.

3.2.1 Preparo das raízes de dentes bovinos

Foram selecionadas raízes de dentes incisivos bovinos para a formação do biofilme *in vitro*. As raízes foram seccionadas horizontalmente na região radicular (Figura 1), utilizando disco de diamante montado sobre uma peça de mão reta de baixa velocidade. Assim, os dentes foram divididos em 2 metades com dimensões de 10 x 5 x 0,6 mm, sendo utilizado somente o terço apical radicular. Os espécimes foram lavados com timol (0,1%) para remoção da matéria orgânica, e depois imersos em NaOCl (2,5%) com EDTA (17%) por 3 minutos e por último lavados com solução salina.

Um polimento ultrafino foi realizado, em politriz, refrigerado por água, com lixa d'água de granulação 600 por 30 segundos; e lixa de silicone de granulação crescente 1200 e 4000, por 60 e 90 segundos, respectivamente. Empregou-se também, para isso, pastas diamantadas (Erios) de 3 e 1 μ m, por 60 e 90 segundos e todos os espécimes foram imersos em Hipoclorito de sódio a 2,5% durante 3 minutos e, em seguida, colocados em banho de ultrassom contendo 17% de EDTA, separadamente. Em seguida, os espécimes foram lavados com solução salina durante 10 minutos e submetidos à esterilização em autoclave durante 30 minutos a 121°C, banhados em solução salina.

Figura 1 - Secção das raízes no plano horizontal da região radicular para preparação dos espécimes



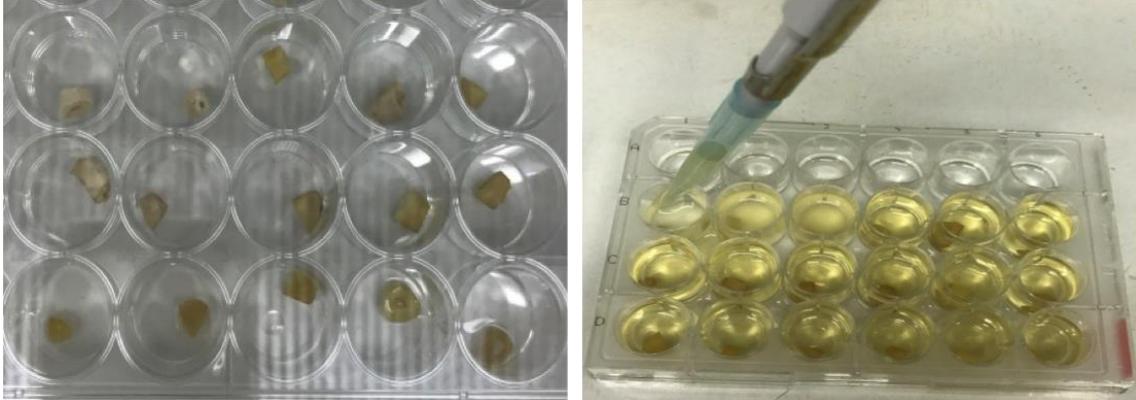
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.2 Formação dos biofilmes em dente bovino

Os espécimes de dentina radicular foram distribuídos em placas de 24 poços (Costar; Corning Life Sciences, Tewksbury, MA) sob condições estéreis com o lado da dentina posicionado para cima (Figura 2). Alíquotas de 200 μ L da suspensão bacteriana, previamente padronizada, de cada cepa (106 células/mL) foram inoculadas em poços contendo 1,8 mL de caldo BHI (Difco, Detroit, MI) (Figura 2). As placas foram mantidas em uma incubadora shaker orbital (Solab, Piracicaba, SP, Brasil) a 37°C com agitação (75 rpm) durante 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas para permitir a formação de biofilme. O Caldo foi trocado a cada 48 horas. Todas as amostras contendo o biofilme foram lavadas com solução salina durante 1 minuto.

Em seguida, os espécimes de dentina com o biofilme foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: um para análise de UFC/mL e outro para análise da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para cada cepa a ser testada, foram utilizados 3 espécimes para a contagem de UFC/mL e 2 espécimes para MEV.

Figura 2 - Posicionamento dos espécimes de dentina radicular nas placas de 24 poços e adição do Caldo BHI e suspensão microbiana para a formação dos biofilmes

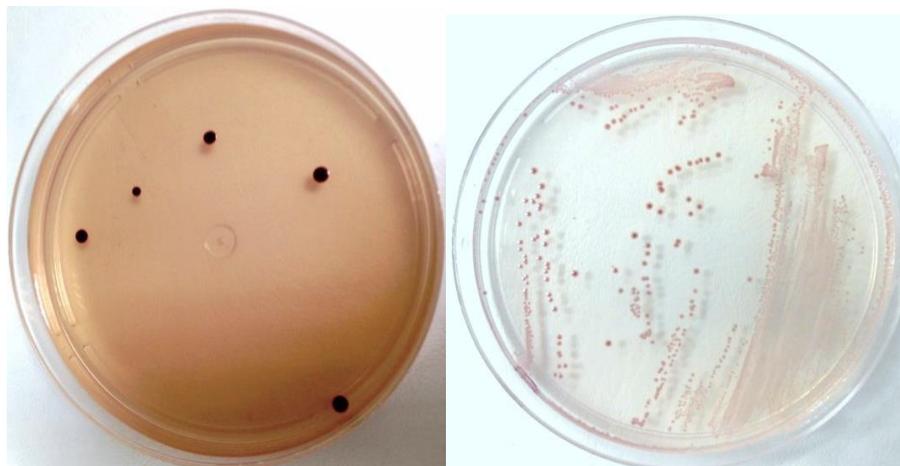


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Análise dos biofilmes por contagem de UFC/mL

Os biofilmes formados, na raiz dos dentes bovinos, foram colocados em solução salina e submetidos ao homogenizador ultrassônico (Sonics Vibra Cell) por 30 segundos, com amplificação de 25%, para o desprendimento celular das células do biofilme. A seguir, um volume de 100 μL foi transferido para tubos Eppendorf contendo 900 μL de solução salina. A partir da solução obtida nos tubos Eppendorf, foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 100 μL foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo: Enterococcus agar (Figura 3). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para determinação do número de UFC/mL.

Figura 3 - Placas de Petri contendo meio de cultura Enterococcus agar, semeadas com *E. faecalis* e *E. faecium*



E. faecalis: cepa 1

E. faecium: cepa 4.2

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Análise do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

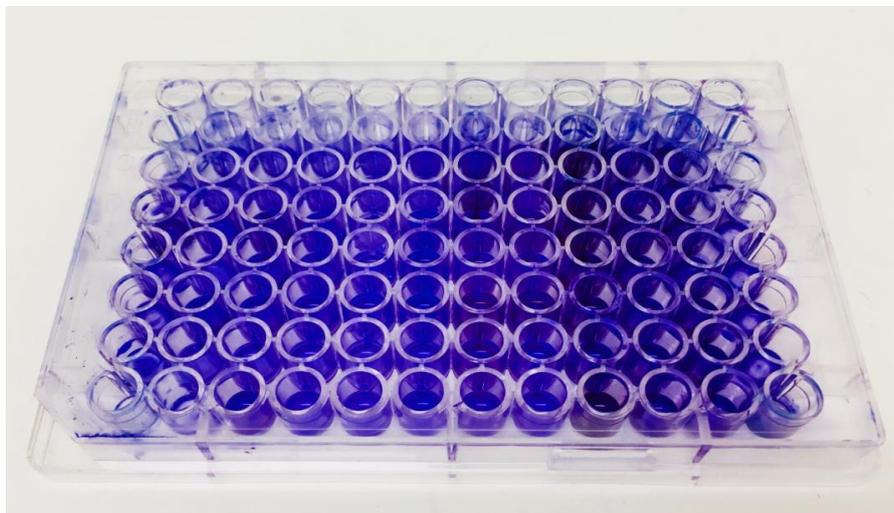
Após a formação do biofilme descrito no item 3.3, os espécimes contendo os biofilmes foram transferidos para placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 hora. Passado este período, os espécimes foram submersos em 1 mL de solução de álcool nas concentrações crescentes de 10, 25, 50, 75 e 90%, por 20 minutos para cada concentração, e posteriormente, em 100% de álcool por 1 hora. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 horas para completa desidratação dos biofilmes. A seguir, os espécimes foram retirados do fundo da placa com o auxílio de uma pinça estéril, transferidos para stubs de alumínio e recobertos com ouro por 160 segundos a 40 mA (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, as peças foram examinadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV - Jeol JSM5600) do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/UNESP).

3.5 Quantificação do biofilme por meio da absorvância em cristal violeta

Após a formação do biofilme nos tempos descritos acima, os espécimes destinados a análise quantitativa foram gentilmente lavadas por 3 vezes em 2 mL de PBS e secas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, o biofilme foi fixado utilizando 2 mL de metanol 99% durante 15 minutos, permanecendo em refrigerador a 15°C durante esse período. O excesso de metanol foi removido com uma micropipeta e então as amostras foram expostas a temperatura ambiente para total evaporação do fixador. Para a coloração do biofilme, as amostras foram transferidas para um novo poço contendo 2 mL de solução aquosa de Cristal Violeta 0,02%, valor ótimo de concentração deste corante para *Enterococcus* ssp. (Peeters, Özyürek, 2016).

Foram aguardados 20 minutos para que ocorresse a completa difusão do corante ao biofilme. Passados 20 minutos, as amostras foram suavemente lavadas por 3 vezes em 2 mL de PBS estéril para remoção do corante não difundido. Posteriormente, as amostras foram transferidas para um novo poço onde foi adicionado 2 mL de metanol 95% para a descoloração do biofilme e liberação do sobrenadante (Jin et al., 2004; Todorović et al., 2002). O sobrenadante do processo de descoloração foi coletado e, 100 µl da solução, transferida para uma placa de 96 poços, em triplicata. Então, a absorvância da solução foi quantificada pelo leitor de Elisa utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Para que somente o valor do Cristal Violeta liberado do processo de descoloração fosse quantificado, foi aferido também o valor da absorvância de 100 µl de metanol 95% e utilizado como valor de referência (branco). Sendo assim, foram obtidos resultados da subtração do valor do branco ao sobrenadante (Figura 4).

Figura 4 - Placa de 96 poços contendo o sobrenadante do Cristal Violeta para análise da quantificação em leitor de Elisa



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey utilizando-se o Programa GraphPad Prism, sendo considerado nível de significância de 5%.

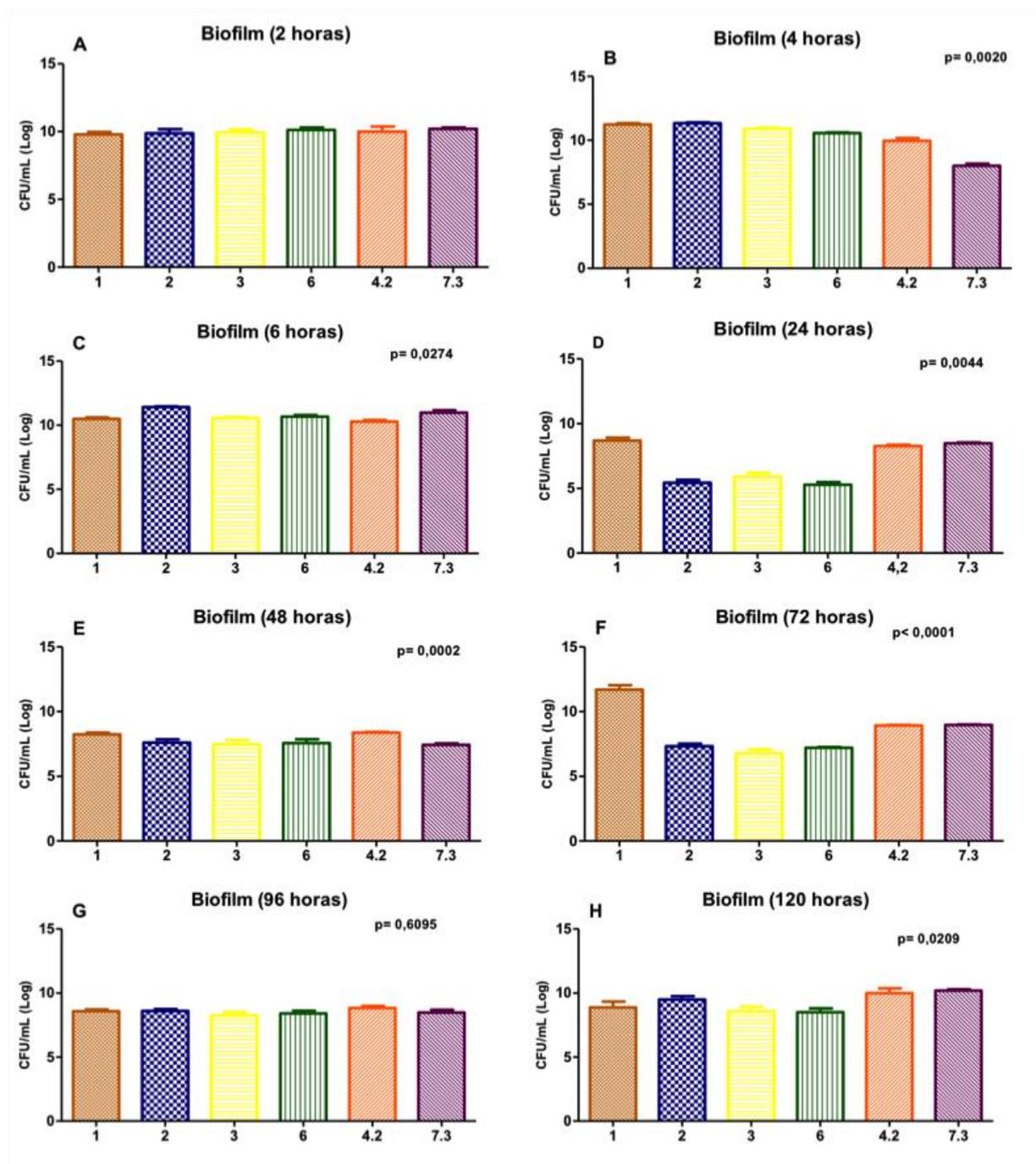
4 RESULTADOS

Foram estudadas 6 cepas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3, *E. faecalis* 6, *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3. As cepas foram submetidas às análises de biofilmes monotípicos por contagem de UFC/mL e análise das imagens por MEV. Já os biofilmes heterotípicos foram analisados através da quantificação do biofilme por meio da absorvância em cristal violeta.

4.1 Análise da formação dos biofilmes monotípicos pela contagem de UFC/mL

As 6 cepas analisadas apresentam grande capacidade para formar biofilmes na dentina radicular, alcançando valores de UFC/mL entre 8 a 12 log (Figura 5). Analisando-se os diferentes tempos experimentais, verificaram-se diferenças estatisticamente significantes entre as cepas nos tempos de 24 e 72 horas, nos quais as maiores quantidades de biofilmes formados ocorreram com a cepa de *E. faecalis* 1 em relação as demais cepas.

Figura 5 - Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) nos diferentes tempos de formação do biofilme para as seguintes cepas clínicas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3 (resistente à tetraciclina), *E. faecalis* 6 (resistente à azitromicina), *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3

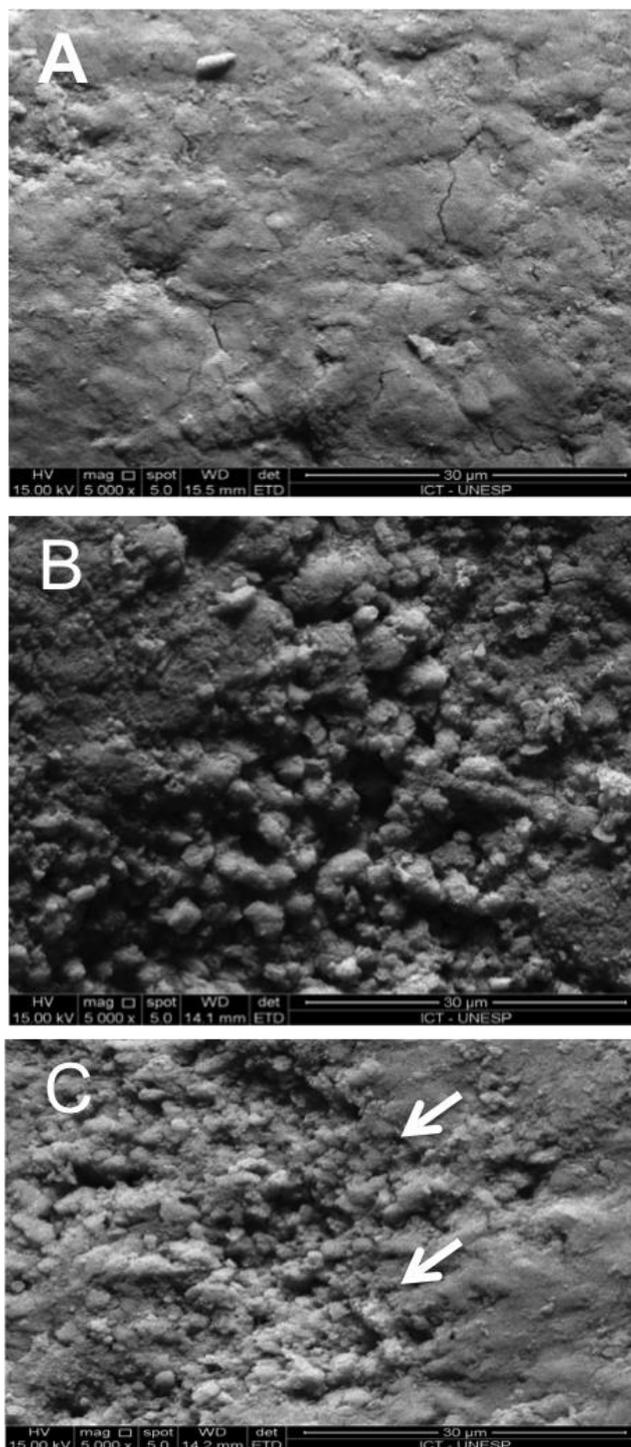


Legenda: Figura A, B,C, D, E, F, G e H: biofilmes 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas consequentemente, onde houve diferença estatisticamente significativa em todos os tempos
 Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise dos biofilmes monotípicos através das imagens realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Primeiramente, foram analisadas imagens dos espécimes de dentina radicular estéreis, sem formação de biofilme, que ficaram submersos em Caldo BHI pelos mesmos tempos dos espécimes submetidos à formação de biofilme. Foi observada uma descontinuidade da superfície radicular, provavelmente, decorrente à desidratação feita durante a preparação e descontaminação dos mesmos antes da formação do biofilme. Também foi possível verificar que a descontinuidade da superfície radicular da dentina ocorreu com maior intensidade nas imagens obtidas no sentido mais apical, possivelmente porque nessas áreas existe uma maior quantidade de túbulos dentinários, terminação de canais laterais, delta apical e canais acessórios (Figura 6).

Figura 6 - Imagens de MEV dos espécimes de dentina radicular estéreis, sem formação de biofilme



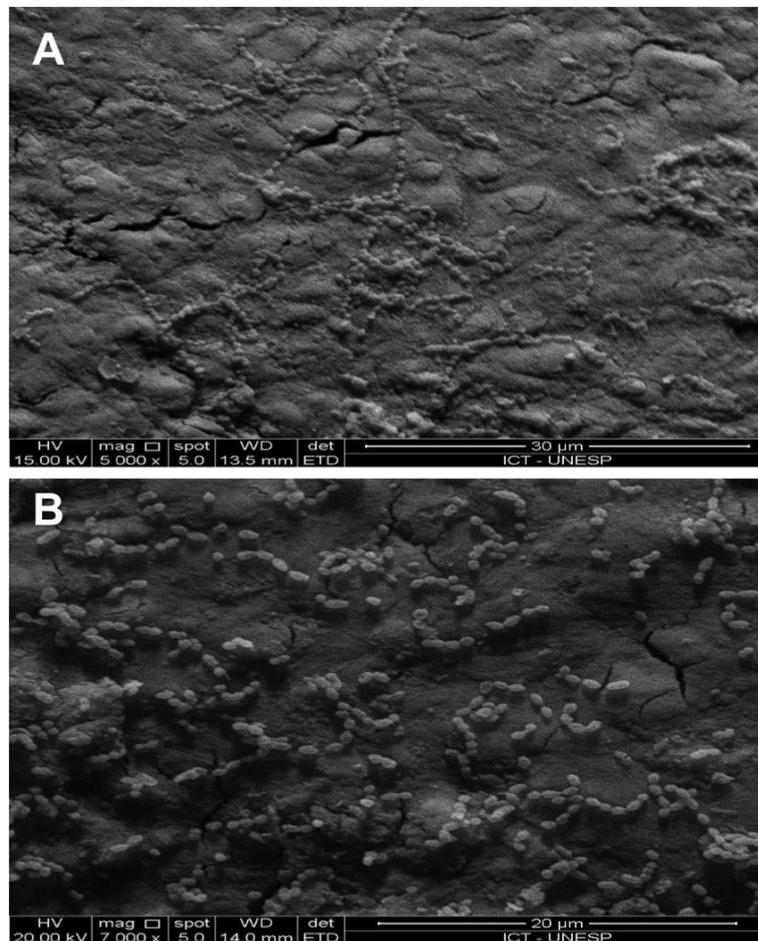
Legenda: A) Região da raiz mais coronária com maior continuidade da superfície dentinária (Aumento de 5000X); B) Região da raiz mais apical com maior descontinuidade da superfície dentinária (Aumento de 5000X); C) Limite visível entre as áreas de maior e menor descontinuidade da superfície dentinária (Aumento de 5000X)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação às análises dos espécimes com formação de biofilme, verificou-se que tanto as cepas clínicas de *E. faecalis*, como as cepas clínicas de *E. faecium*, apresentaram capacidade de colonizar e formar biofilme em toda a superfície radicular analisada, não sendo possível observar diferenças na quantidade de biofilme formado entre as cepas (Figura 7).

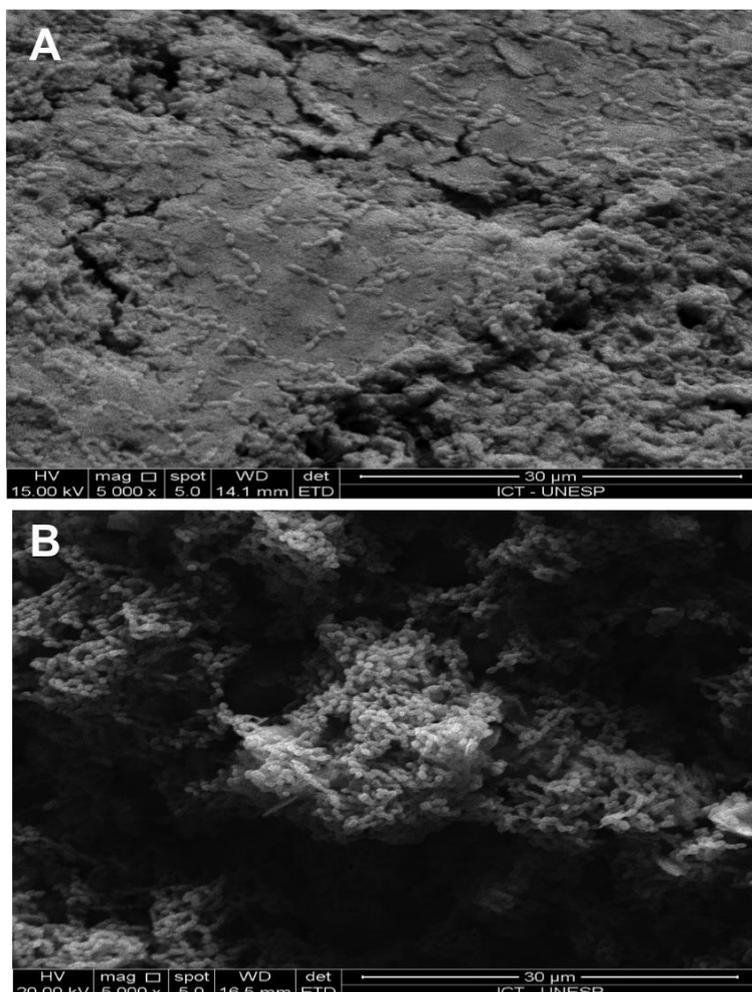
Foi possível observar, também, um aumento do biofilme com o passar do tempo, verificando-se que após 120 horas ocorreu a formação de um biofilme maduro com grande aglomerado de células bacterianas e formação de possíveis canais de água, os quais são usados para nutrição das células localizadas mais profundamente nos biofilmes (Figura 8). Em algumas imagens, também, foi possível notar a proximidade das células de *Enterococcus* com os túbulos dentinários, indicando uma facilidade de penetração e colonização nos túbulos dentinários (Figura 9).

Figura 7 - Imagens de MEV dos espécimes de dentina radicular submetidas à metodologia de formação de biofilme por 6 horas



Legenda: Verifica-se a aderência na superfície dentinária de cocos, frequentemente formando arranjos de cadeias, que são características do gênero *Enterococcus*: A) cepa de *E. faecalis* 2 (Aumento de 5000X); B) cepa de *E. faecium* 4.2 (Aumento de 7000X)
Fonte: Elaborada pelo autor.

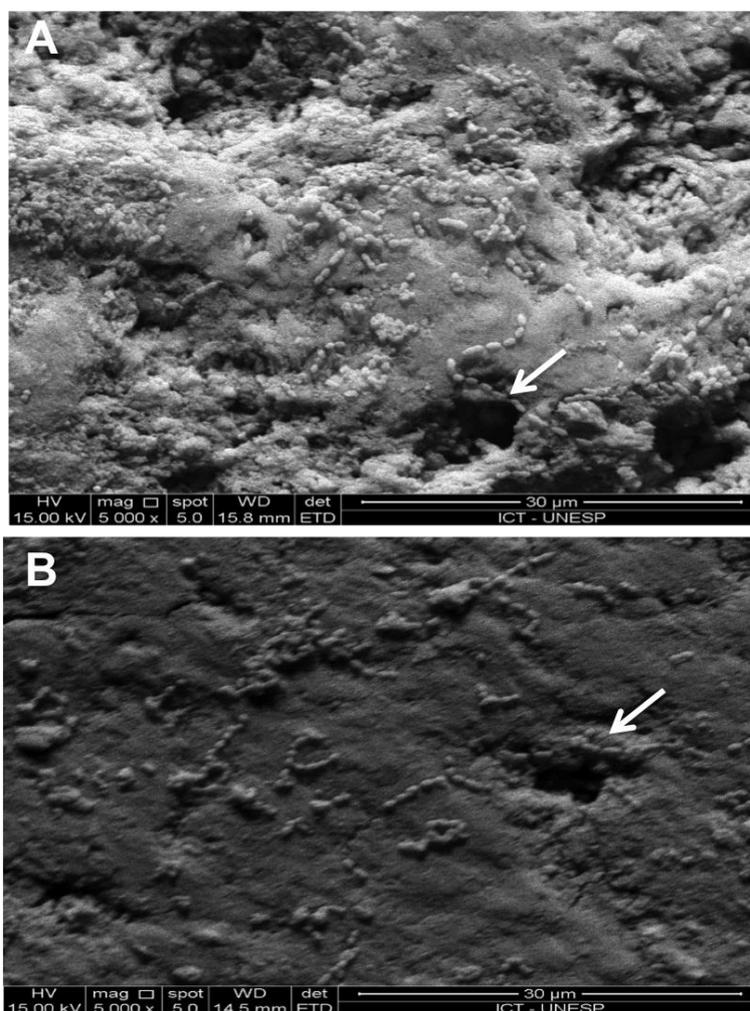
Figura 8 - Imagens de MEV dos espécimes de dentina radicular submetidas à metodologia de formação de biofilme com a cepa *E. faecalis* 1



Legenda: A) Tempo de formação do biofilme de 6 horas, no qual observa-se vários cocos aderidos à superfície dentinária (Aumento de 5000X); B) Tempo de formação do biofilme de 120 horas, demonstrando um biofilme maduro com intenso aglomerado de células bacterianas e formação de canais de água (Aumento de 5000X).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 - Imagens de MEV dos espécimes de dentina radicular submetidas à metodologia de formação de biofilmes, no período de 6 horas, com a cepa *E. faecalis* 1



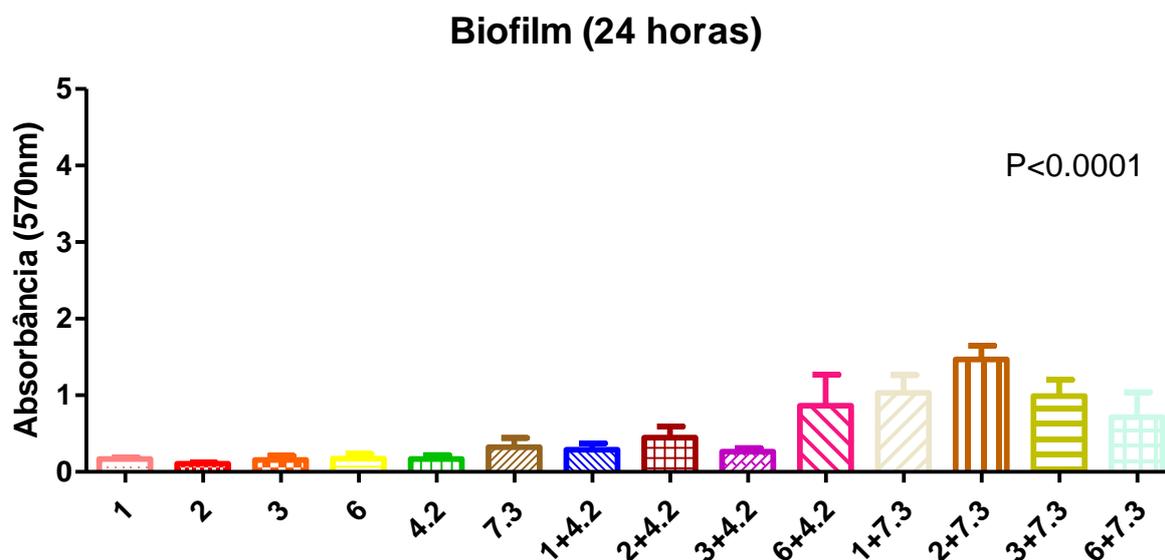
Legenda: A e B) Verifica-se a presença de várias células bacterianas próximas aos túbulos dentinários (Aumento de 5000X).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Análise da formação dos biofilmes monotípicos e heterotípicos pela quantificação da biomassa total

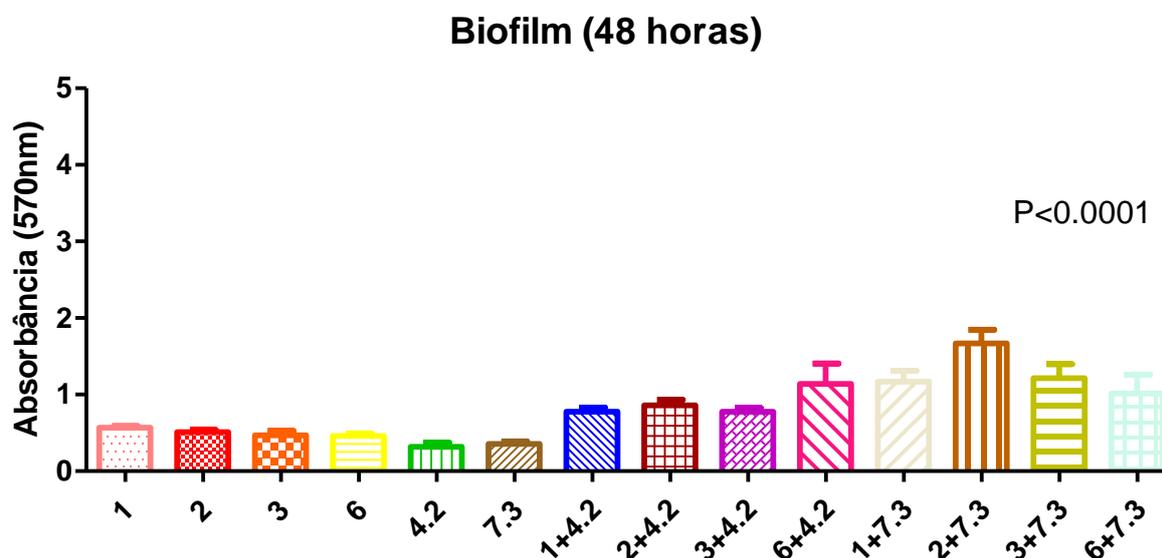
Analisando os gráficos obtidos na quantificação da biomassa total dos biofilmes monotípicos, podemos observar que todas as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* foram capazes de formar biofilmes, atingindo o ápice após 120 horas. Comparando os biofilmes monotípicos e heterotípicos, podemos afirmar que quando colocamos cepas de *E. faecalis* junto com *E. faecium*, esse biofilme apresentou um crescimento significativamente maior do que quando essas cepas foram colocadas isoladamente. Sendo que com o passar dos tempos essa diferença foi aumentando e se tornando muito expressiva em 120 horas (Figuras 10-14).

Figura 10 - Média e desvio padrão dos dados de quantificação da biomassa total no tempo de 24 horas de formação do biofilme monotípicos e heterotípicos para as seguintes cepas clínicas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3 (resistente à tetraciclina), *E. faecalis* 6 (resistente à azitromicina), *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3



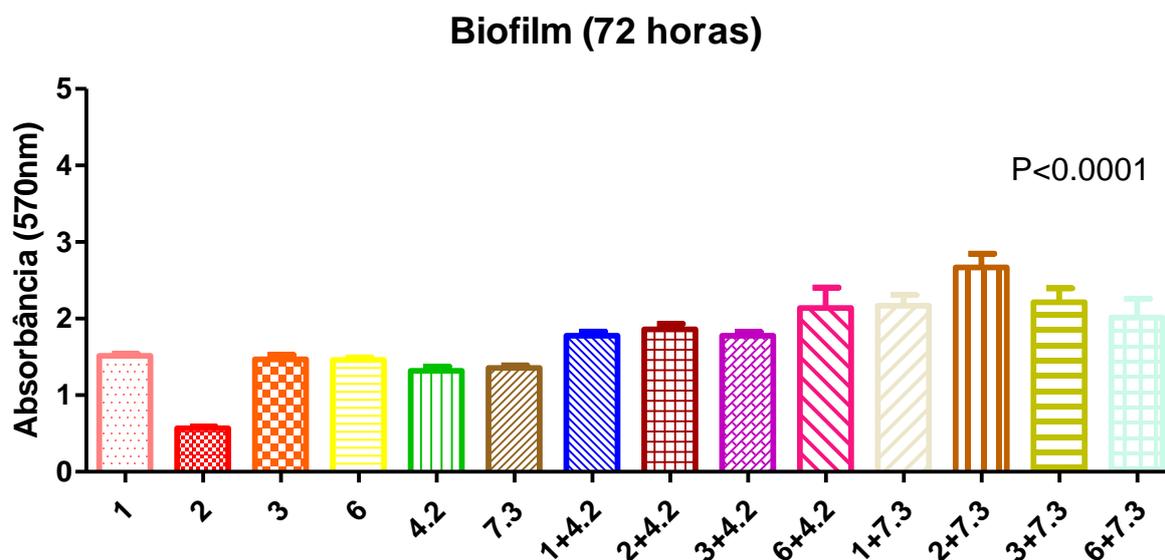
Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 - Média e desvio padrão dos dados de quantificação da biomassa total no tempo de 48 horas de formação do biofilme monotípicos e heterotípicos para as seguintes cepas clínicas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3 (resistente à tetraciclina), *E. faecalis* 6 (resistente à azitromicina), *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3



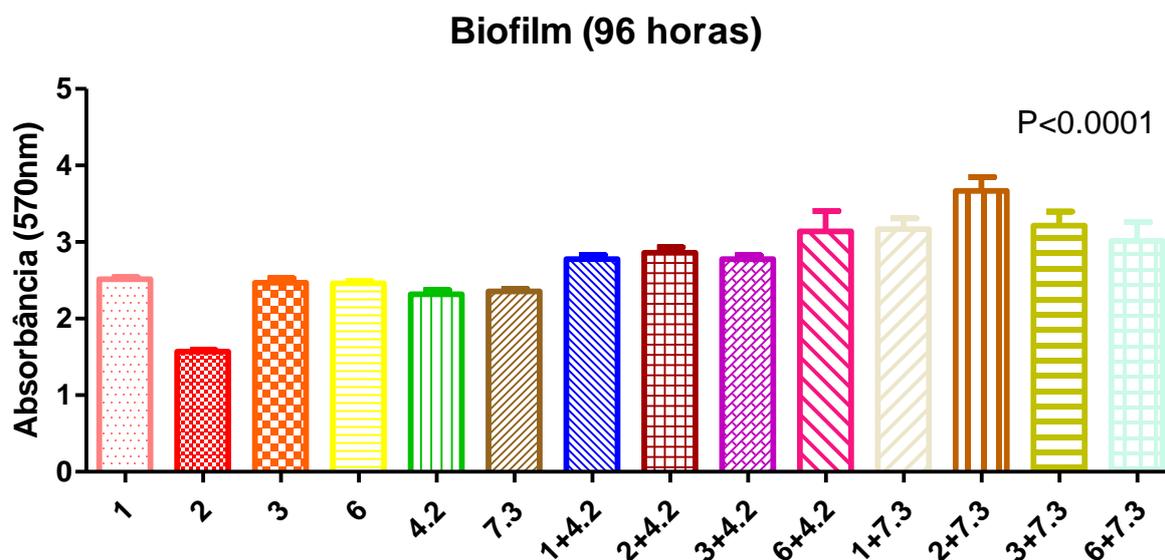
Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Média e desvio padrão dos dados de quantificação da biomassa total no tempo de 72 horas de formação do biofilme monotípicos e heterotípicos para as seguintes cepas clínicas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3 (resistente à tetraciclina), *E. faecalis* 6 (resistente à azitromicina), *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3



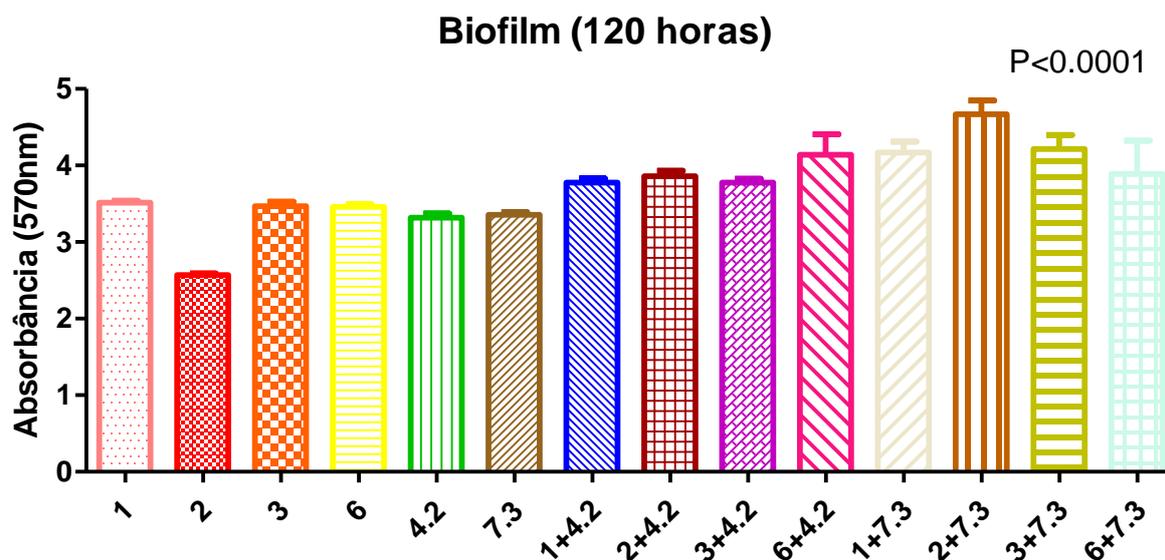
Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Média e desvio padrão dos dados de quantificação da biomassa total no tempo de 96 horas de formação do biofilme monotípicos e heterotípicos para as seguintes cepas clínicas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3 (resistente à tetraciclina), *E. faecalis* 6 (resistente à azitromicina), *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3



Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 - Média e desvio padrão dos dados de quantificação da biomassa total no tempo de 120 horas de formação do biofilme monotípicos e heterotípicos para as seguintes cepas clínicas: *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3 (resistente à tetraciclina), *E. faecalis* 6 (resistente à azitromicina), *E. faecium* 4.2 e *E. faecium* 7.3



Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos
Fonte: Elaborada pelo autor.

5 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). *E. faecalis*, também é frequentemente encontrado na cavidade bucal, sendo detectado em infecções endodônticas assintomáticas e persistentes. Pinheiro et al. (2004) relataram que *E. faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada dos canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico, estando presente em 52% dos canais radiculares com culturas positivas. Dados semelhantes também foram encontrados por Molander et al. (1998), Sundqvist et al. (1998), Hancock (2001) e Gomes et al. (2016), que isolaram *E. faecalis* em, respectivamente, 47, 38, 32 e 46% dos canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico. Assim, a persistência de *E. faecalis* em canais radiculares parece estar relacionada com seus mecanismos de virulência, como a capacidade de formar biofilmes e competir com outros micro-organismos (Stuart et al., 2006).

Estudos mais recentes demonstraram que em infecções hospitalares, *E. faecalis* tem sido encontrado em biofilmes mistos, juntamente com *E. faecium*, em 24 a 77% dos casos de infecções por *Enterococcus* (Garcez et al., 2013). Assim, o objetivo do nosso estudo foi comparar *E. faecium* com *E. faecalis* em relação à capacidade de formação de biofilmes em dentina radicular e avaliar a interação microbiana entre essas duas espécies em biofilmes mistos.

Para isso, foram selecionadas 6 cepas clínicas isoladas de canais radiculares de pacientes com infecções endodônticas, sendo 4 de *E. faecalis* e 2 de *E. faecium* (Santos, 2014). Inicialmente, foi avaliada a capacidade das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* em formar biofilmes monotípicos em raízes de dentes bovinos por meio da técnica de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados demonstraram que todas as cepas estudadas foram capazes de colonizar e formar biofilmes na superfície radicular, independentemente da espécie estudada. Foram encontrados valores de 8 a 12 log de UFC dependendo do período de avaliação.

Em relação a espécie *E. faecalis*, vários estudos prévios já demonstraram

sua grande capacidade de formação de biofilme (Faria-Junior et al., 2013; Barros et al., 2014; Kapralos et al., 2018). Utilizando-se do método de contagem de células viáveis, Faria-Junior et al. (2013), Barros et al. (2014) e Kapralos et al. (2018), também, encontraram valores superiores a 8 log de *E. faecalis* em biofilmes formados, respectivamente, sobre raízes de dentes bovinos, membranas de nitrocelulose e membranas de politetrafluoretileno. Embora muitos estudos tenham demonstrado que cepas de *E. faecalis* apresentam grande capacidade de formar biofilmes sobre diferentes materiais ou estruturas dentárias (Lim et al., 2017), poucos estudos foram realizados com cepas de *E. faecium*. Wang L et al. (2016) analisaram a capacidade de cepas padrão de *E. faecalis* (ATCC4083) e *E. faecium* (ATCC35667) em formar biofilmes monotípicos sobre discos de resina por meio da contagem de células viáveis (UFC) e determinação da biomassa total (método do cristal violeta). Esses autores verificaram que a contagem de células viáveis de *E. faecalis* e *E. faecium* foi em torno de 9 log de UFC e a biomassa total formada não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as duas espécies. Esses dados concordam com nossos achados, confirmando que a espécie *E. faecium* tem a mesma capacidade da espécie *E. faecalis* para formar biofilmes monotípicos.

Nesse estudo, diferenças na capacidade de formação de biofilmes foram encontradas apenas entre as cepas de *E. faecalis* estudadas, pois a cepa de *E. faecalis* 1 apresentou média de UFC significativamente maior do que as demais cepas analisadas. Saffari et al. (2017) realizaram um estudo de comparação da formação de biofilme em diferentes cepas clínicas, e demonstraram que de 123 cepas de *E. faecalis*, 90% tinham genes responsáveis pela formação de biofilme. Segundo Khalifa et al. (2016), apesar da base genética da formação de biofilmes por *E. faecalis* ainda ser desconhecida, a Proteína de Superfície Celular Específica de Enterococcus (Esp) é considerada um fator crítico para a formação do biofilme.

No presente estudo, os dados obtidos na contagem de UFC também foram confirmados pela análise dos biofilmes monotípicos por Microscopia Eletrônica de Varredura, na qual foi verificada a adesão e colonização das cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* sobre a superfície radicular após 6 horas de observação, que levou a formação de um biofilme maduro com o decorrer do tempo de estudo. Provavelmente, as áreas de irregularidade da superfície da dentina radicular observadas nas imagens, principalmente na região mais apical, devem ter

contribuído para a adesão bacteriana e formação do biofilme. De acordo com Costa et al. (2010), a persistência das infecções endodônticas podem ser atribuídas à permanência dessas bactérias em áreas de difícil acesso, como lacunas de reabsorção, canais laterais e túbulos dentinários. Sabe-se que *E. faecalis* possui grande capacidade de colonizar os sistemas de canais radiculares, utilizando-se dos substratos oriundos dos fluídos dos tecidos conjuntivos subjacentes (osso alveolar e ligamento periodontal). Esses micro-organismos também podem expressar alguns fatores de virulência, como enzimas citolíticas, substâncias de agregação e ácido lipoteicóico (Paganelli et al., 2017; Honsa et al., 2017).

Na análise de Microscopia Eletrônica de Varredura, também foi verificada a presença de várias células de *Enterococcus* nas proximidades dos túbulos dentinários, confirmando que essas bactérias podem facilmente penetrar e colonizar os túbulos dentinários. Wang Z et al. (2014) analisaram biofilmes de *E. faecalis* formados em raízes de dentes humanos por Microscopia Confocal, verificando-se uma penetração densa e homogênea de *E. faecalis* no interior dos túbulos dentinários. Silva et al. (2014) relataram que *E. faecalis* é capaz de invadir os túbulos dentinários e sobreviver por longos períodos de tempo sem nutrientes, características que os protegem contra os agentes antimicrobianos usados na endodontia. Embora muitos estudos de microscopia eletrônica tenham sido realizados para descrever os biofilmes de *E. faecalis* em dentinas radiculares, não existem estudos desse tipo que analisaram biofilmes de *E. faecium*. Assim, pela primeira vez na literatura, nosso trabalho descreve que as células de *E. faecium* formam biofilmes sobre a superfície da dentina radicular de forma semelhante ao *E. faecalis*.

Após os estudos dos biofilmes monotípicos de *E. faecalis* e *E. faecium* por análise de contagem de células viáveis e Microscopia Eletrônica de Varredura, o próximo passo desse estudo foi investigar a interação dessas duas espécies em biofilmes mistos. Com esse objetivo, os biofilmes formados foram analisados pela quantificação da biomassa total utilizando-se o método do cristal violeta. Vários métodos de avaliação e quantificação dos biofilmes foram desenvolvidos recentemente, buscando-se o entendimento das interações complexas estabelecidas entre as espécies microbianas, que podem envolver mecanismos sinérgicos ou antagônicos. Os estudos atuais têm sido mais focados em modelos de

biofilmes multi-espécies, do que monoespécies, por fornecem uma condição mais realística da situação *in vivo* do sistema de canais radiculares. Como sabe-se que as propriedades do biofilme estão intimamente relacionadas com a sua estrutura dimensional, os estudos *in vitro* de biofilmes, também, estão sendo mais dirigidos à análise da arquitetura do biofilme, e não apenas à quantificação de células viáveis (Neelakantan et al., 2017). Para análise da estrutura do biofilme, vários métodos têm sido propostos, como a coloração pelo cristal violeta, que permite a quantificação da biomassa total, incluindo células viáveis, células mortas e matriz extracelular (Costa et al., 2014; Yuksel et al., 2017; Kart et al., 2017; Fan et al., 2017).

Os resultados obtidos no método de coloração pelo Cristal Violeta, demonstraram que os biofilmes heterotípicos formados por *E. faecalis* e *E. faecium* tiveram um aumento expressivo na sua formação em relação aos biofilmes monotípicos dessas espécies. Esses dados sugerem a existência de uma interação sinérgica entre *E. faecalis* e *E. faecium*, o que pode tornar ainda mais difícil o controle das infecções endodônticas. Até o presente momento, não existem trabalhos na literatura que avaliaram biofilmes mistos de *E. faecalis* com *E. faecium* em dentinas radiculares.

Gao et al. (2016) estudaram o comportamento de *E. faecalis* em biofilmes mistos com outras espécies microbianas de interesse na cavidade bucal. Esses autores formaram biofilmes, de duas espécies, sobre dentinas radiculares de dentes bovinos, nos quais *E. faecalis* foi combinado com os seguintes micro-organismos: *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus* e *Lactobacillus acidophilus*. Foi verificado que os biofilmes mistos tornaram *E. faecalis* mais resistentes a carência de nutrientes e aumentaram a quantidade de biofilmes formados. Nos biofilmes mistos, *E. faecalis* formou biofilmes mais densos e espessos na dentina radicular, sendo esses efeitos mais proeminentes na coexistência com *S. gordonii* e *A. viscosus* do que quando em contato com *C. albicans* e *L. acidophilus*.

Esses dados sugerem que estudos adicionais devem ser realizados para o melhor entendimento da interação sinérgica de *E. faecalis* e *E. faecium* nos biofilmes mistos, procurando-se investigar, principalmente, os mecanismos de interação célula a célula e a cooperação metabólica estabelecidas entre eles.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* apresentaram a mesma capacidade de formar biofilmes sobre a superfície radicular. Além disso, em biofilmes mistos, essas duas espécies estabeleceram relações ecológicas sinérgicas, aumentando significativamente a formação de biofilmes.

REFERÊNCIAS*

- Albuquerque MT, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC. Effects of Ciprofloxacin-containing Scaffolds on *Enterococcus faecalis* Biofilms. J Endod. 2015 May;41(5):710-4. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.025.
- Almaroof A, Niazi SA, Rojo L, Mannocci F, Deb S. Evaluation of dental adhesive systems incorporating an antibacterial monomer eugenyl methacrylate (EgMA) for endodontic restorations. Dent Mater. 2017 Feb 25. pii: S0109-5641(17)30114-8. doi: 10.1016/j.dental.2017.01.016.
- Andrade AD, Cifuentes P, Oliveira MC, Anam R, Roos BA, Ruiz JG. Avatar-mediated home safety assessments: piloting a virtual objective structured clinical examination station. J Grad Med Educ. 2011 Dec;3(4):541-5. doi: 10.4300/JGME-D-11-00236.1.
- 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.
- 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.
- Barros J, Silva MG, Rôças IN, Gonçalves LS, Alves FF, Lopes MA, et al. Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. J Endod. 2014 Aug;40(8):1167-71. doi: 10.1016/j.joen.2013.12.021.
- 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.
- Bukhary S, Balto H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. J Endod. 2017 Apr;43(4):643-7. doi: 10.1016/j.joen.2016.09.013.
- Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Ponce de León S, Amieva-Fernández RI, Agis-Juárez RA, Huebner J, et al. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. PLoS One. 2013;8(4):e59491. doi: 10.1371/journal.pone.0059491.

* 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

Costa EMMB, Barbosa AS, Arruda TA, Oliveira PT, Dametto FR, Carvalho RA, et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. J Bras Patol Med Lab. 2010;46(3):175-80.

Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. Carbohydr Polym. 2014 Jan 30;101:1081-6. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.041.

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: 10.3402/jom.v4i0.10855. Published online 2012 Feb 22. doi:10.3402/jom.v4i0.10855PMCID:PMC3285953

Fan W, Huang Z, Fan B. Effects of prolonged exposure to moderate static magnetic field and its synergistic effects with alkaline pH on *Enterococcus faecalis*. Microb Pathog. 2017 Dec 11;115:117-22. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.028.

Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. Int Endod J. 2013 Aug;46(8):755-62. doi: 10.1111/iej.12055.

Gao Y, Jiang X, Lin D, Chen Y, Tong Z. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. J Endod. 2016 Aug;42(8):1233-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.05.002.

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 Med Sci. 2013 Jan;28(1):79-85. doi: 10.1007/s10103-012-1073-8.

Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. Pathog Dis. 2016 Apr;74(3). pii: ftw006. doi: 10.1093/femspd/ftw006.

Hancock RE. A brief on bacterial biofilms. Nat Genet. 2001 Dec;29(4):360. doi:10.1038/ng1201-360.

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.

Honsa ES, Cooper VS, Mhaisien MN, Frank M, Shaker J, Iverson A, et al. RelA Mutant *Enterococcus faecium* with Multiantibiotic Tolerance Arising in an Immunocompromised Host. MBio. 2017 Jan 3;8(1). pii: e02124-16. doi: 10.1128/mBio.02124-16.

Jin P, Chen Q, Hao L, Tian R, Zhang L, Wang L. Synthesis and catalytic properties of nickel-silica composite hollow nanospheres. J Phys Chem B. 2004 May 20;108(20):6311-4. doi: 10.1021/jp049754g.

Jorge AOC. Microbiologia e Imunologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 384 p.

Kapralos V, Koutroulis A, Ørstavik D, Sunde PT, Rukke HV. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers against Planktonic Bacteria and Bacteria in Biofilms. J Endod. 2018 Jan;44(1):149-154. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.023.

Kart D, Kustimur AS, Sağıroğlu M, Kalkancı A. Evaluation of Antimicrobial Durability and Anti-Biofilm Effects in Urinary Catheters Against *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates and Reference Strains. Balkan Med J. 2017 Dec 1;34(6):546-552. doi: 10.4274/balkanmedj.2016.1853.

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.

Khalifa L, Shlezinger M, Beyth S, Houry-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Beyth N, et al. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. J Oral Microbiol. 2016 Sep 16;8:32157. doi: 10.3402/jom.v8.32157.

Kopper R. 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.

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.

Lewis JD, Enfield KB, Cox HL, Mathers AJ, Sifri CD. A single-center experience with infections due to daptomycin-nonsusceptible *Enterococcus faecium* in liver transplant recipients Transpl Infect. Dis. 2016 Mar 8. doi: 10.1111/tid.12523.

Lim SY, Teh CSJ, Thong KL. Biofilm-Related Diseases and Omics: Global Transcriptional Profiling of *Enterococcus faecium* Reveals Different Gene Expression Patterns in the Biofilm and Planktonic Cells. OMICS. 2017 Oct;21(10):592-602. doi: 10.1089/omi.2017.0119.

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

Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 11;18(8). pii: E1748. doi: 10.3390/ijms18081748.

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.

Paganelli FL, van de Kamer T, Brouwer EC, Leavis HL, Woodford N, Bonten MJ, et al. Lipoteichoic acid synthesis inhibition in combination with antibiotics abrogates growth of multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017 Mar;49(3):355-363. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.12.002.

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 American hospitals. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1562-9. doi: 10.1128/JCM.02526-09.

Peeters D, Özyürek A. This and That Revisited: A Social and Multimodal Approach to Spatial Demonstratives. *Front Psychol.*2016;7: 222. Published online 2016 Feb 16. doi: 10.3389/fpsyg.2016.00222

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

Ramsey AM, Zilberberg MD. Secular trends of hospitalization with vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in the United States, 2000-2006. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009 Feb;30(2):184-6. doi: 10.1086/593956.

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): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2014.

Saffari F, Dalfardi MS, Mansouri S, Ahmadrajabi R. Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates. *Infect Chemother.* 2017 Sep;49(3):176-183. doi: 10.3947/ic.2017.49.3.176.

Silva EJ, Coutinho-Filho WP, Andrade AO, Herrera DR, Coutinho-Filho TS, Krebs RL. Evaluation of photodynamic therapy using a diode laser and different photosensitizers against *Enterococcus Faecalis*. *Acta Odontol Latinoam.* 2014;27(2):63-5. doi: 10.1590/S1852-48342014000200003.

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 CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006 Feb;32(2):93-8.

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.

Tang J, Wang L, Xi Y, Liu GA. Three-year survey of the antimicrobial resistance of microorganisms at a Chinese hospital. Exp Ther Med. 2016 Mar;11(3):731-736.

Thein ZN, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009;52:467-75.

Todorović N, Djordjević V, Antonijević S. Results of histopathologic findings of endometrial changes in metrorrhagia. Srp Arh Celok Lek. 2002 Nov-Dec;130(11-12):386-8.

Tripathi A, Shukla SK, Singh A, Prasad KN. Prevalence, outcome and risk factor associated with vancomycin-resistant *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* at a Tertiary Care Hospital in Northern India Indian J Med Microbiol. 2016 Jan-Mar;34(1):38-45. doi: 10.4103/0255-0857.174099.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus Faecalis* biofilms. J Endod. 2014 Apr;40(4):505-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.042.

Wang L, Xie X, Weir MD, Fouad AF, Zhao L, Xu HH. Effect of bioactive dental adhesive on periodontal and endodontic pathogens. J Mater Sci Mater Med. 2016 Nov;27(11):168.

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.

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.

Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm formed on tooth substrate. J Clin Exp Dent. 2017 Mar 1;9(3):e361-e367. doi: 10.4317/jced.53210. eCollection 2017.

Yuksel FN, Karatug NT, Akcelik M. Does subinhibitory concentrations of clinically important antibiotic induce biofilm production of *Enterococcus Faecium* strains? *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2017 Dec 15:1-12. doi: 10.1556/030.64.2017.041

Zijngue V, Van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer, T. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.

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.