

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

MARIELI CHITOLINA PRADEBON

USO DE BACTERIÓFAGOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* COMO
ESTRATÉGIA AUXILIAR DE DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS
RADICULARES E SISTEMA DE TÚBULOS DENTINÁRIOS

Porto Alegre

2021

MARIELI CHITOLINA PRADEBON

USO DE BACTERIÓFAGOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* COMO
ESTRATÉGIA AUXILIAR DE DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS
RADICULARES E SISTEMA DE TÚBULOS DENTINÁRIOS

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Endodontia.

Linha de Pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêutica em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo

Porto Alegre

2021

CIP – Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

CHITOLINA PRADEBON, MARIELI
USO DE BACTERIÓFAGOS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS COMO
ESTRATÉGIA AUXILIAR DE DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE
CANAIS RADICULARES E SISTEMA DE TÚBULOS DENTINÁRIOS /
MARIELI CHITOLINA PRADEBON. -- 2021.
81 f.
Orientador: JOSE ANTONIO POLI DE FIGUEIREDO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa
de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2021.

1. BACTERIÓFAGOS . 2. ENTEROCOCCUS FAECALIS . 3.
TÚBULOS DENTINÁRIOS. 4. SISTEMA DE CANAIS RADICULARES
. 5. ANTIBIÓTICO. I. POLI DE FIGUEIREDO, JOSE ANTONIO,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus por me permitir viver este grande sonho que é o mestrado, e por ter vivido experiências incríveis e momentos muito felizes nesta jornada.

Aos meus pais e grandes amigos Mario Pradebon e Sueli Chitolina Pradebon, aos meus irmãos e melhores amigos da vida Ana Paula C. Pradebon e Dener C. Pradebon. Todas minhas conquistas são conquistas de vocês também, eu não teria feito nem metade desse caminho se não fosse por vocês, pela ajuda, apoio, incentivo de vocês, a toda hora e todo momento. Obrigada por serem minha base, por estarem por mim em tantos momentos difíceis que sabemos, e claro nos bons também. Esse mestrado não é só meu, cada pedacinho dele é de vocês também. Eternamente grata pelo suporte, dedicação, por não terem medido esforços para com a minha educação e dos meus irmãos. Quem eu sou devo a vocês quatro. Estas palavras são poucas para definir meu amor por vocês.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Antônio Poli de Figueiredo por tanto. Por eu ter sido selecionada como sua orientada, por ter aprendido muito com o senhor durante todo o mestrado, pelas incríveis oportunidades. Por acreditar no meu potencial, mesmo eu tendo dúvidas sobre isto. Obrigada por toda a tua atenção e paciência comigo. Sabe que sempre falo, se eu for 10% do que o senhor é, eu já estou feliz. Obrigada pela tua humildade em todos os momentos, por me permitir aprender contigo. Por ser esse ser humano incrível mesmo, um exemplo para minha carreira e por guiar meus passos. Grata também por sempre dizer que tudo daria certo, mesmo quando eu achava que não daria tempo lá no primeiro semestre. De coração muito obrigada “prof Figue”.

Obrigada também a Aleksandra Palatinska-Ulatowska, do Departamento de Endodontia da Universidade de Łódź na Polônia, pelo auxílio com o estudo sobre bacteriófagos e pelo isolamento do bacteriófago para *E. faecalis* para que pudéssemos dar andamento e seguimento com o estudo utilizando o fago ATCC 29212.

Obrigada ao professor Liviu Steier, do departamento de Dentística da Universidade da Pensilvânia (EUA), pela sua colaboração e por compartilhar o seu conhecimento sobre bioluminescência, para que também pudéssemos inserir em nossos estudos.

À professora Magda de Sousa Reis, que despertou na graduação (UNISC-RS) em mim essa vontade de querer ser Mestre. Sempre admirei muito a senhora, obrigada por todas as oportunidades em que pude aprender com a senhora e os demais professores da endodontia UNISC.

Obrigada as minhas amigadas da vida, algumas da infância, outras da faculdade, outras pela vivência, pelo suporte de sempre, por me ouvirem, darem conselhos, puxarem a orelha, serem positivas, pelas risadas, e por serem vocês todos esses momentos. E por compartilharem comigo essa jornada do início ao fim. Amo vocês. Tamara Grando, Bárbara Ballardin, Anelise Fontoura, Júlia Gabriela Hergemooler, Marcela Corti, Natália Sartori, Kamila Panisson e Renan Ferreira.

A minha amiga do batizado para vida também Damaris Raquel Bertoldi, que me recebeu super bem em Porto Alegre, me apresentou a cidade, me estendeu a mão, por me ouvir e por também ser aquela pessoa que não só fala o que você quer ouvir, mas o que você precisa ouvir. Você sabe o quanto sou grata por tudo, amo você amiga. E também ao Fernando Almeida, esposo da Damaris, vocês foram muito importantes nessa caminhada. Obrigada de coração.

Um obrigada ao mestrado pelas amigadas que fiz, sentirei muitas saudades da nossa turma, a melhor ousou dizer. Acredito que falta muito no mundo, na nossa profissão a amizade e parceria que construímos nesses dois anos. Todos sempre dispostos a se ajudar em todos os momentos, a rir quando era para rir, e a ser sério quando era pra ser. Fico feliz com os laços que construímos, e torço muito pelo sucesso de todos. Obrigada por dividirem esta experiência comigo. Theodoro Weissheimer, Angélica Fensterseifer Lemos, Renata Aqel de Oliveira e Luana Heck.

Um grande obrigada à Angélica Fensterseifer Lemos que me ajudou e assistiu minha apresentação antes do grande dia, dando todo seu apoio com muito humor, como eu já havia dito, uma irmã mais velha da pós-graduação. Conta comigo sempre!

Obrigada também ao Felipe Barros Matoso e a Patrícia Chaves, amigadas que o mestrado me proporcionou. Obrigada por permitirem aprender tanto com vocês como amigos, professores e colegas.

Obrigada também à Lívia Alvariza e à Thaís Marchand, pela amizade, parceria e ajuda nos nossos trabalhos e pesquisas que desenvolvemos e iremos ainda desenvolver. Amei nossa equipe. Vocês são sensacionais. À Jordana Koch e a Kellyn Souza também pela ajuda na coleta dos dentes bovinos, espero que nos anos seguintes possamos conviver mais.

Ao meu primo Pedro Polla da Costa, que fez as animações sobre bacteriófagos para que pudessem ser usados na apresentação no dia da minha defesa, muito obrigada Pedro por achar um tempinho e me ajudar! Conta sempre comigo!

Sou grata à Escola de Ciências da Saúde da PUCRS pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos através da pesquisa laboratorial e aprendizado com a Juliana Sumiensi, Maila, Vanessa, Ingrid e a Professora Dra. Silvia Dias de Oliveira, e por abraçarem este projeto conosco.

Aos **professores da área de Endodontia do programa de pós-graduação da UFRGS** pelos ensinamentos ao longo desses dois anos. Agradecimentos aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS, pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** da UFRGS e a **Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)** por permitir que o mestrado fizesse parte da minha vida. Grata pela oportunidade de estudo.

De modo geral, agradeço de coração a todos que, direta ou indiretamente, estiveram comigo durante esses anos e me apoiaram para que eu conseguisse percorrer esse caminho da melhor forma possível.

It's your road, and yours alone,
others may walk it with you, but no
one can walk it for you.

Rumi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Biofilmes bacterianos.....	17
1.2 <i>E. faecalis</i>	20
1.3 Bacteriófagos.....	22
1.4 Bacteriófagos <i>versus</i> Antibióticos.....	27
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
4. PROJETO PILOTO.....	41
4.1 Metodologia.....	41
4.1.1 Seleção e Preparo das Amostras.....	41
4.1.2 Análise Estatística.....	41
4.1.3 Limpeza e Esterilização das Amostras.....	42
4.1.4 Preparo da Cultura e Inoculação.....	44
4.1.4.1 <i>E. faecalis</i>	44
4.1.4.2 Bacteriófagos.....	45
4.1.5 Classificação dos grupos de tratamento e incubação das amostras	46
4.2 Bioluminescência.....	47
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
4.4 Resultados.....	48
4.5 Fatores de Dificuldade e possíveis Soluções do Projeto Piloto.....	51
4.5.1 Cianocrilato para adesão das amostras às tampas dos Microtubos.....	51
4.5.2 Trocas de Meio de Cultura.....	52
4.5.3 Sistemática de Inoculação dos Bacteriófagos.....	52
4.5.4 Tempo de Armazenamento das Amostras em Glutaraldeído.....	53
4.5.5 Período de permanência dos fagos agindo nos canais radiculares.....	53
4.5.6 Microtubos Utilizados.....	53
4.5.7 Dentes Humanos X Dentes Bovinos e Protocolo de Desinfecção do Sistema de Canais Radiculares.....	54
5. DISCUSSÃO	54
6. PERSPECTIVAS FUTURAS PARA O ESTUDO.....	64

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
Anexo 1 – Lista de Projetos Aprovados pela Comissão de Pesquisa (COMPESQ) da faculdade de Odontologia da UFRGS.....	81

RESUMO

O *Enterococcus faecalis*, é uma bactéria facultativa que se encontra presente em canais infectados, provocando infecções de difícil tratamento. É considerado um patógeno predominante para infecções periapicais persistentes e tem como uma de suas principais características a capacidade de formar biofilme. Além disso e de seus fatores de virulência aumentados, o *E. faecalis* apresenta um aumento da capacidade de aderência e aumento da resistência aos antimicrobianos. Os bacteriófagos ou fagos são um conjunto de vírus capazes de destruir bactérias específicas causadoras de doenças, invadindo células bacterianas, interrompendo seu metabolismo e causando lise celular. Anteriormente à descoberta e uso de antibióticos, a terapia por fagos era alternativa às infecções presentes. Este trabalho tem por objetivo estabelecer o potencial do uso de bacteriófagos no combate a infecções endodônticas associadas a *E. faecalis* como auxiliar de desinfecção do sistema de canais radiculares e sistemas de túbulos dentinários. Através de estudo piloto realizado em dentes humanos unirradiculares, seguida de visualização do biofilme por bioluminescência e pela Microscopia eletrônica de varredura (MEV), embasado na literatura existente. Os resultados mostraram-se eficazes frente ao uso de bacteriófagos e bioluminescência em relação ao *E. faecalis*, sendo possível notar uma redução significativa das bactérias presentes no interior do canal radicular. Este estudo nos permitiu delinear uma alternativa de ação frente ao biofilme endodôntico, complementar à ação de antimicrobianos, buscando entender melhor o funcionamento do biofilme endodôntico, dos fagos e suas aplicações na endodontia.

Palavras-Chave: Bacteriófagos, *Enterococcus faecalis*, Endodontia, biofilme.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis, is a facultative bacterium that is present in necrotic root canals, causing infections that are difficult to treat. It is considered a predominant pathogen for persistent periapical infections and one of its main characteristics is the ability to form biofilm. In addition to that and its increased virulence factors, *E. faecalis* has an increased adherence capacity and increased resistance to antimicrobials. Bacteriophages or phages are a set of viruses capable of destroying specific disease-causing bacteria, invading bacterial cells, interrupting their metabolism and causing cell lysis. Previously to the discovery and use of antibiotics, phage therapy was an alternative to fight infections. The aim of this work is to establish the potential of bacteriophage use to combat endodontic infections associated with *E. faecalis* as an aid to disinfect the root canal system and dentinal tubule systems. The literature review was supplemented by a pilot study with uniradicular human teeth, followed by biofilm visualization through bioluminescence and scanning electron microscopy (SEM). The results suggested that the use of bacteriophages and bioluminescence may be effective against *E. faecalis*, being possible to notice a significant bacterial reduction present inside the root canal. This study allowed us to outline an alternative action against endodontics biofilm, complementary to the antimicrobials action, seeking to better understand the functioning of endodontics biofilm, phages and their applications in endodontics.

Keywords: bacteriophages, *Enterococcus faecalis*, Endodontics, biofilms.

FIGURAS

Figure 1 – In an *E. faecalis* biofilm, Qubit fluorophore and ReVeal (Design for Visions, New York, USA) using 400 nm UV light, root canal before (a) and after (b) phage therapy. (Images provided by the authors from a pilot study).....**pág. 36**

Figure 2 – Scanning Electron Microscopy (SEM 20.000x) of *E. faecalis* biofilm, canal before (a) and after (b) phage therapy. Note that structure of bacteria is totally modified or destroyed by phages. (Images provided by the authors from a pilot study).....**pág.37**

Figura 3 - Amostras nos microtubos, envoltos por micropore com inserção de meio cultura por orifício lateral.....**pág. 43**

Figura 4 - Disposição das amostras em caixa de polipropileno.....**pág. 44**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL - microlitro

μm – Micrômetro

BHI – Brain heart infusion (ágar cérebro coração)

CEP-UFRGS - Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

COMPESQ - Comitê de Pesquisa do ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DNA - ácido desoxirribonucleico

dpi - Dots per inch (Pontos por Polegada)

E. faecalis – Enterococcus faecalis

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

FIB SEM - Microscopia eletrônica de varredura de feixe de íons focalizados

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

MA - Ácido maleico

mbar – milibar (unidade de pressão)

MDR – multirresistente a drogas (multidrug-resistant)

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

mL – Mililitro (unidade de medida)

MRSA – Multirresistente a *Staphylococcus aureus* (Multi-resistant to *Staphylococcus aureus*)

NAOCL – Hipoclorito de sódio

Nm – nanômetro

PCD - Programmed cell death (morte celular programada)

PDR - pan-resistente a drogas (pan-resistant to drugs)

pH - potencial de hidrogênio, representação da escala na qual uma solução neutra é igual a 7

PUI – Passive Ultrasonic Irrigation (Irrigação ultrassônica passiva)

RNA - ácido ribonucleico

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

TIFF - Tagged Image File Format (Formato de Arquivo de Imagem com Tags)

URSS - União das Repúblicas Socialistas Soviéticas

US\$ - Moeda /dólar americano

VRE – Vancomicina

XDR - extremamente resistente a drogas (extremely drug resistant)

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado contém como estrutura principal um artigo científico que está formatado nas normas do *Frontiers in Microbiology*. Por esse motivo, o artigo se encontra de acordo com as normas estabelecidas pela revista citada.

Apresenta também como parte de sua estrutura um Projeto Piloto. Este estudo foi aprovado na Comissão de Pesquisa Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (COMPESQ) sob número 34070 (Anexo 1).

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos do tratamento endodôntico é a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (KAKEHASHI et al., 1965; MÖLLER et al., 1981), além da redução do número de bactérias presentes no canal radicular impossibilitando que novos microrganismos colonizem a região periapical, viabilizando o reparo (NAIR et al., 2006).

O acesso limitado dos instrumentos endodônticos, das soluções irrigadoras, e a presença de complexidades anatômicas favorecem a permanência de microrganismos que se organizam na forma de biofilme (NAIR et al., 2006).

A doença endodôntica é uma infecção na qual o mediador é o biofilme (RICUCCI et al., 2010), onde temos as bactérias como os principais agentes causadores de inflamação pulpar e periapical (KAKEHASHI et al., 1965).

Para promover a redução bacteriana é necessário desorganizar esta estrutura por meios mecânicos, deixando as bactérias mais vulneráveis à ação química dos agentes antimicrobianos (SIQUEIRA et al., 2009). O desbridamento do sistema de canais radiculares é necessário para que ocorra a redução bacteriana, deixando estas mais suscetíveis a ação dos agentes antimicrobianos.

Quando realizamos um tratamento de canal temos como objetivo eliminar as bactérias que ali estão presentes, bem como prevenir e evitar uma recontaminação (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1981). A taxa de sucesso de um tratamento endodôntico é maior após a instrumentação químico-mecânica quando os dentes apresentam-se livres de bactérias (BYSTRÖM et al., 1987, SJOGREN et al., 1997).

Ricucci e colaboradores (2010) afirmaram que as bactérias se encontram presentes no formato de biofilme, apresentando-se aderidas às paredes dos canais radiculares e no interior dos túbulos dentinários.

Às vezes uma infecção é resistente durante o tratamento convencional, um possível motivo para que isso ocorra pode estar correlacionado com bactérias que invadiram os túbulos dentinários (HAAPASALO, ORSTAVIK, 1987).

Os organismos inseridos nos biofilmes possuem uma taxa metabólica baixa, vivendo em um ambiente competitivo e por isso tendem a ser resistentes a substâncias antimicrobianas (CLEGG et al., 2006).

No tratamento endodôntico utilizamos repetidamente e alternadamente agentes antimicrobianos. Desta forma, as células podem criar condições que as façam se adaptar

gerando uma resposta a esse estresse, aumentando sua sobrevivência (EVANS et al., 2001).

As superfícies que compõem a cavidade oral são revestidas por inúmeras bactérias, que determinam o biofilme bacteriano (AAS et al., 2005). A adesão bacteriana se tornou uma área de grande importância na pesquisa de doenças infecciosas (GIBBONS, 1989).

O *E. faecalis* apresenta como uma de suas principais características a capacidade de formar biofilme (AFKHAMI et al., 2015; WILSON et al., 2015), e para atingir o sucesso do tratamento endodôntico é de grande importância a sua remoção (BUKHARY, BALTO, 2017). A remoção do biofilme é difícil já que eles são fontes de muitas infecções. Desta forma, os bacteriófagos que são vírus que tem a capacidade de destruir bactérias específicas causadoras de doença, entram neste contexto como alternativa ao combate dos biofilmes endodônticos.

1.1 Biofilmes bacterianos

Os biofilmes apresentam como componentes primários proteínas extracelulares e polissacarídeos os quais apresentam papel fundamental para que a sobrevivência celular, a persistência microbiana e a interação celular ocorram. Além disso, eles protegem as bactérias de agentes antimicrobianos, estresse ambiental, tornando-as de 10 a 1000 vezes mais resistentes (KUMAR et al., 2019).

Os biofilmes estão envolvidos em uma matriz polimérica extracelular que favorece a resistência a muitos medicamentos e soluções químicas irrigantes, assim podemos considerá-los como estruturas organizadas (BASMACI et al., 2013; DASILVA et al., 2013; HALL-STOODLEY et al., 2004; WILSON et al., 2015). São considerados organizações complexas de um conjunto de microrganismos no interior de uma matriz extracelular espessa, encontrados em superfícies sólidas, tecidos, e responsáveis por inúmeras doenças crônicas (ALEMAYEHU et al., 2012).

Sabe-se que a erradicação do biofilme é difícil, e que eles também são fontes de muitas infecções recalcitrantes. Conforme Lewis (2001) um biofilme é uma população de células que apresenta crescimento em uma superfície e está inserida em uma matriz de exopolissacarídeo.

Nair em 1987, foi o primeiro a estabelecer uma relação causa-efeito entre as estruturas de biofilme em canais radiculares infectados. Ele examinou o conteúdo do

canal radicular de 31 dentes com o auxílio de Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), os espaços bacterianos foram preenchidos por material amorfo e recebeu a interpretação de uma matriz extracelular de origem bacteriana. Ainda neste mesmo estudo, a parede de dentina do canal radicular, apresentava-se recoberta por agregados bacterianos sob a forma de biofilme visíveis ao nível de microscopia eletrônica, em que muitos tipos bacterianos puderam ser observados. As formas filamentosas costumavam aderir-se de forma perpendicular à parede dentinária, assim como as formas cocóides que aparentavam formar cadeias de células orientadas na mesma direção. Quase que raramente a camada bacteriana sob a forma de biofilme apresentava espessura o suficiente para ser vista com o microscópio de luz, assemelhando-se a uma estrutura em paliçada (NAIR, 1987).

A resistência microbiana é a capacidade de um microrganismo crescer na presença de um nível elevado de um antimicrobiano (LEWIS, 2001). A resistência referida por Lewis (2001) se dá em relação ao aumento resistência celular. E é neste contexto que os biofilmes se destacam, eles dificilmente são erradicados por antimicrobianos. A capacidade de inibição do crescimento dos biofilmes por parte dos antimicrobianos mostra que eles são capazes de agir normalmente contra seus alvos e de se disseminarem através do próprio biofilme. Ainda há poucos estudos os quais se referem à difusão de antimicrobianos através de biofilmes (LEWIS, 2001).

Os principais fatores de insucesso que podemos considerar para explicar a resistência dos biofilmes são: a penetração restrita de antimicrobianos no próprio biofilme, expressão de possíveis genes de resistência e redução da taxa de crescimento (LEWIS, 2001). O exopolímero de biofilme protege as células fisicamente dos componentes do sistema imunológico (HOYLE et al., 1990; VON EIFF et al., 1990).

Agregações de microrganismos em biofilmes podem apresentar desencadeamentos clínicos diversos, principalmente em relação ao tratamento, independentemente de estarem presentes dentro dos canais radiculares ou na superfície externa da raiz (SVENSATER et al., 2004).

A persistência da doença nos tecidos periapicais está mais correlacionada às dificuldades ou deformações que ocorrem durante ou após o tratamento endodôntico inicial. Porém, acredita-se que a principal causa da doença pós-tratamento endodôntico é a permanência dos microrganismos na região apical do canal radicular em dentes obturados (PECIULIENE et al, 2008).

A permanência dos microrganismos se dá principalmente por: controle asséptico inadequado, desenho de cavidade de acesso deficiente, canais não localizados, instrumentação inadequada e infiltração de restaurações temporárias ou definitivas (PECIULIENE et al, 2008).

As infecções endodônticas podem ser classificadas conforme a sua localização anatômica, por exemplo, infecção intra-radicular ou extraradicular, e também conforme o tipo de infecção, se primária, secundária ou persistente. Os principais microrganismos encontrados nas infecções endodônticas são as bactérias, mesmo que eventualmente outros microrganismos tenham sido encontrados esporadicamente, como: fungos, arqueias e vírus (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2019).

Na infecção primária do canal radicular as espécies bacterianas dominantes são diferentes dependendo do estágio desse processo dinâmico (Peciuliene et al, 2008), sendo provocada por microrganismos que invadem inicialmente o tecido pulpar necrótico e o colonizam. Inúmeros grupos bacterianos Gram-negativos e Gram-positivos foram identificados nas infecções primárias (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2009).

As bactérias Gram-negativas anaeróbias são os microrganismos mais comuns presentes em infecções primárias, muitos bastonetes Gram-positivos também são frequentemente presentes no consórcio microbiano endodôntico (Siqueira JF & Rôças, 2009). Bactérias estritamente anaeróbicas são típicas da periodontite apical primária, juntamente com alguns anaeróbios facultativos, como é o caso dos estreptococos (PECIULIENE et al., 2001).

Os táxons mais frequentemente identificados em infecções primárias são as espécies de *Prevotella*, principalmente *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *P. baroniae* e *P. denticola*, (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2009).

A infecção secundária é ocasionada por microrganismos que não estavam presentes na infecção primária, e em algum momento foram introduzidos no canal radicular, após a intervenção profissional (SIQUEIRA, 2002). O *E. faecalis* é considerado a principal espécie presente na periodontite apical secundária e a espécie mais frequentemente isolada (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998).

Já uma infecção persistente tem como causa: microrganismos membros de uma infecção primária ou secundária que resistiram de alguma forma aos procedimentos antimicrobianos intracanal, e resistiram a privação de nutrientes nos canais tratados (SIQUEIRA, 2002).

O ambiente existente no canal obturado é exigente, portanto, apenas microrganismos que consigam se adaptar a estas condições têm a chance de se estabelecer no canal obturado (PECIULIENE et al., 2001).

Em infecções persistentes, o isolamento de bactérias e o teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos podem ser úteis para o clínico, ajudando-o na escolha do tratamento adequado (HAAPSALO et al., 1983).

O conhecimento a respeito dos principais patógenos endodônticos e suas implicações na patogênese das doenças perirradiculares permite que subsídios sejam fornecidos para desenvolver estratégias antimicrobianas que sejam eficazes no tratamento de infecções endodônticas primárias, persistentes ou secundárias (RÔÇAS et al., 2004).

1.2 *Enterococcus faecalis*

As espécies que pertencem ao gênero *Enterococcus* são capazes de colonizar o trato geniturinário e a cavidade oral, também são encontrados em muitos ambientes (RÔÇAS et al., 2004), como no trato gastrointestinal de humanos, de outros mamíferos e em aves, répteis, insetos, plantas, água e solo (RÔÇAS et al., 2004; LOWDE et al., 2014).

O *E. faecalis* usualmente é localizado na microbiota gastrointestinal humana e animal, e possuem a capacidade de sobreviver em ambientes e superfícies por extensos períodos de tempo (LOWDE et al., 2014).

O gênero *Enterococcus* é composto por cocos Gram positivos (RÔÇAS et al., 2004; MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998), com forma esférica que não forma esporos, fermentativo e facultativamente anaeróbio (RÔÇAS et al., 2004). O *E. faecalis* pode ser considerado como a espécie que apresenta maior resistência ao preparo químico-mecânico e à medicação intracanal (PECIULIENE et al, 2008).

O *E. faecalis* é a espécie mais comumente isolada ou detectada nas infecções orais, dentro das espécies de *Enterococcus* (RAMS et al., 1992). A prevalência de enterococos nas infecções endodônticas primárias (SUNDQVIST et al., 1989) e em infecções persistentes (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998) foi relatada quase que exclusivamente através estudos usando cultivo (RÔÇAS et al., 2004).

O *E. faecalis* tem sido mais frequentemente isolado ou detectado em casos de falha da terapia endodôntica (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PECIULIENE et al., 2001), e é encontrado ocasionalmente nos casos de infecções

endodônticas primárias (SUNDQVIST et al., 1989; BAUMGARTNER, FALKLER, 1991; LANA et al., 2001).

A persistência de *E. faecalis* no interior de canais radiculares mesmo após o tratamento endodôntico está associada à sua habilidade de formação de biofilme e à sua virulência (DONLAN et al., 2002; HARMSEN et al., 2015; JENKINSON et al., 2001), inclusive é difícil conseguir erradicar o *E. faecalis* de um canal infectado, sendo este um problema significativo durante o tratamento de canal (EVANS et al., 2001).

Conforme cita Nacif e colaboradores (2010), o *E. faecalis* é uma espécie microbiana que apresenta sucesso na colonização do sistema de canais radiculares, ele também possui capacidade de tolerar e adaptar-se a situações ambientais que outras espécies não possuem.

Com excelente capacidade adaptativa e se mantendo em condições adversas no microambiente, o *E. faecalis* se encontra presente em 90% dos casos de infecção persistente (LACERDA et al., 2016).

O *E. faecalis* apresenta também fatores de virulência que podem ser o motivo de sua sobrevivência em ambientes hostis dentro do sistema de canais radiculares: fatores secretados, adesinas, estruturas superficiais como polissacarídeo capsular e a resistência a antibióticos (PECIULIENE et al., 2008) e que podem estar envolvidos na causa da doença (JETT et al., 1994). Esses fatores de virulência incluem citolisina (lítica em relação às células de mamíferos selecionadas), ácido lipoteicóico (envolvido na adesão às superfícies do hospedeiro; estimula a produção de citocinas pelos monócitos), substância de agregação (envolvida na ligação a leucócitos e matriz extracelular conectiva), feromônios (pequenos peptídeos lineares envolvidos em transferência de plasmídeos e quimio atraente para neutrófilos) e enzimas líticas, como gelatinase e hialuronidase (que podem estar envolvidas no dano ao tecido) (JETT et al., 1994).

Para que um determinado microrganismo possa sobreviver em um canal radicular obturado, este microrganismo deve suportar períodos de inanição e apresentar resistência aos procedimentos intracanalais de desinfecção (RÔÇAS et al., 2004). O *E. faecalis* é a espécie bacteriana encontrada em maior frequência em dentes tratados endodonticamente capaz de sobreviver nessas condições de inanicação (GAO et al., 2016).

O *E. faecalis* apresenta resistência frente a ação do hidróxido de cálcio (SUNDQVIST et al., 1998; EVANS et al., 2002; BYSTRÖM et al. 1985, HAAPASALO, ØRSTAVIK 1987), que é um medicamento intracanal habitualmente utilizado no

tratamento endodôntico. Essa sua capacidade de resistência a altos níveis de pH parece estar relacionada a uma bomba de prótons em funcionamento, a qual impulsiona prótons na célula acidificando o citoplasma (EVANS et al., 2002), permitindo que o *E. faecalis*, adapte-se a variáveis condições ambientais (JETT et al., 1994).

Além de formar biofilme e de fatores de virulência aumentados, o *E. faecalis* apresenta um aumento da capacidade de aderência e aumento da resistência aos antimicrobianos (STEWART et al., 2001; ABDULLAH et al., 2005), ele também consegue penetrar no interior dos túbulos dentinários, adquirindo proteção física frente a ação do preparo químico-mecânico e a curativos intracanal (DISTEL et al., 2002; LOVE 2001).

1.3 Bacteriófagos

Bacteriófagos ou fagos são um conjunto de vírus capazes de destruir bactérias específicas causadoras de doenças, invadindo células bacterianas, interrompendo seu metabolismo e causando lise (KHALIFA et al., 2016).

Bacteriófagos ou “fagos” são os vírus que infectam bactérias e usam seus recursos bacterianos. A palavra “bacteriófago” em si significa: comer bactérias. É assim conhecida porque bacteriófagos virulentos podem levar a lise competitiva de uma cultura bacteriana suscetível (WOMMACK et al., 2000).

Em 1915 os bacteriófagos foram descobertos por Frederick Twort, porém, a era do bacteriófago, só começou a partir do momento em que ocorreu a publicação seminal de Félix d'Hérelle em 1917, através do título “un bactériophage obligatoire” (ADEBON, 2011).

Os fagos assim como as bactérias, são extremamente comuns nos ambientes naturais e estão diretamente relacionados ao número de bactérias presentes. Com uma estimativa de 1.032 bacteriófagos no planeta, eles representam as formas de 'vida' mais abundantes na Terra (WOMMACK et al., 2000). Os bacteriófagos foram descobertos há mais de um século (ORLOVA, 2012) e eles apresentam especificidade em seu espectro de atividade (HANLON, 2007).

Os vírus não apresentam metabolismo, não apresentam meios de locomoção e são partículas sem vida. Eles servem como portadores de seu próprio genoma durante a disseminação célula a célula e transmissão organismo a organismo. São estruturas que protegem o genoma (RNA ou DNA) no decorrer do trânsito e o entregam ao citosol ou

ao núcleo de novas células hospedeiras, normalmente junto com proteínas acessórias (COSSART et al., 2014). Nos dias de hoje conforme Ackermann (2003), o ICTV classifica os vírus em três ordens, 61 famílias e 241 gêneros.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios. Eles necessitam transportar seu genoma para o citosol ou núcleo das células infectadas para que possam se multiplicar e assim gerar progênie. Enquanto as bactérias e os parasitas eucarióticos possuem outras opções, e na sua maioria podem se replicar por conta própria (COSSART et al., 2014).

Muitas das doenças disseminadas e devastadoras que acometem humanos e animais tem como causa vírus e bactérias, que entram nas células para replicação (COSSART et al., 2014). Os vírus são partículas infecciosas muito pequenas e que não são possíveis de se serem vistos em um microscópio de luz. Cada vírus vai infectar um certo tipo de célula, a qual chamamos de célula hospedeira. A doença viral tem como principal característica a lise celular, que é quando uma célula se rompe e subsequentemente morre (ORLOVA, 2012).

Os vírus se fazem presentes de inúmeras formas e infectam praticamente todos os sistemas vivos: desde animais, a plantas, insetos e bactérias. Todos os vírus apresentam um genoma, geralmente apenas um tipo de ácido nucleico, mas também pode ser uma ou várias moléculas de DNA ou RNA, envolto por um capsídeo (revestimento protetor estável) e ainda, às vezes, por camadas adicionais que podem ser muito complexas e conter carboidratos, lipídios e proteínas adicionais (ORLOVA, 2012).

Os bacteriófagos serviram primeiramente como agentes terapêuticos sob uma gama de nomes comerciais diferentes (*Bacte - intesti - fagos*, *Bacte - pio - fagos*, *Bacte - coli - fagos*, *Bacte - rino - fagos* e *Bacte - Staphy - phage*) isso durante a primeira parte do século XX (ABEDON et al., 2011). Os fagos desempenham papéis de grande importância para o controle e evolução das populações bacterianas (STERN et al., 2011).

Mesmo tendo sido descobertos há mais de um século (ORLOVA, 2012), os bacteriófagos foram reconhecidos em 1915, por apresentarem potencial para o controle de doenças bacterianas (HARPER et al, 2014), e têm sido usados rotineiramente na Europa Oriental para tratar uma variedade de infecções (NAKONIECZNA et al., 2015). Os bacteriófagos são vírus que infectam apenas bactérias (HARPER et al, 2014).

Morfologicamente os fagos apresentam-se diversos (ACKERMANN, 2005). Cada vírion tem uma cabeça (capsídeo) poliédrica (ORLOVA, 2012) predominantemente icosaédrica, que contém o genoma do vírus (ACKERMANN, 2005; ORLOVA, 2012).

As cabeças dos fagos são compostas por inúmeras cópias de uma ou várias proteínas diferentes e apresentam uma organização muito estável (ORLOVA, 2012).

Por meio de um conector que serve como um adaptador, a cauda de bacteriófago é ligada ao capsídeo. O conector entre eles é um heterooligômero composto por numerosas proteínas (LURZ et al., 2001).

Estruturalmente as características básicas dos bacteriófagos são revestimentos (ou capsídeos) que tem como função proteger o genoma escondido dentro de um capsídeo e estruturas adicionais que fornecem interface com uma membrana bacteriana para a liberação do genoma (ORLOVA, 2012).

A cauda e suas estruturas são indispensáveis, porque garantem a entrada do ácido nucleico viral na bactéria hospedeira. A cauda atua como um transmissor de sinal e como um duto através do qual o DNA é transportado à célula hospedeira durante a infecção (ORLOVA, 2012).

As caudas podem ser curtas ou longas, as longas podem ser contráteis ou não (ORLOVA, 2012; THURBER, 2009), estão conectadas ao capsídeo através de um pescoço curto (ACKERMANN, 2005). Na porção caudal final da maioria dos fagos várias fibras se estendem a partir de uma placa base para reconhecerem os receptores que os levam a fixação na célula hospedeira (ACKERMANN, 2005; HARPER et al, 2014). Pili, flagelo ou parede celular são os locais de fixação dos bacteriófagos (ACKERMANN, 2005).

Os bacteriófagos com tais caudas pertencem à ordem Caudovirales caracterizada por genomas de DNA e pela organização geral comum das partículas de vírus caracterizada por um capsídeo e uma cauda (HARPER et al, 2014; ORLOVA, 2012). Os bacteriófagos sem cauda podem ter genomas de DNA ou ácido ribonucleico (RNA), e estes podem ser de fita simples ou dupla. A forma física desses fagos sem cauda é altamente variável (HARPER et al, 2014).

Os fagos com cauda caracterizam a maior população de bacteriófagos. São mais fáceis de encontrar e de purificar, e também eles são a família mais estudadas em relação aos bacteriófagos, tanto bioquimicamente quanto estruturalmente (ORLOVA, 2012). Os fagos caudais são divididos em três famílias: A - Myoviridae com caudas contráteis consistindo em uma bainha e um tubo central (25% dos fagos com cauda); B - Siphoviridae, caudas longas não contráteis (61%); C- Podoviridae, cauda curta (14%) (ORLOVA, 2012; LEIMAN et al., 2010; ACKERMANN, 2009).

Para que o processo de replicação ocorra, os bacteriófagos necessitam de uma célula hospedeira. O espectro de atividade dos bacteriófagos é estreito e a maioria pode infectar apenas uma única espécie, ou apenas cepas particulares dessa espécie, em alguns casos isso pode conferir vantagens e desvantagens aos fagos (HANLON, 2012).

A explicação mais simples da replicação de bacteriófagos se resume em dois ciclos ou estilo de vida, lítico e lisogênico (temperado) (GOLAIS Et al., 2013; DRULIS-KAWA et al., 2012; SONG 2020, CHOPIN et al., 2001 ; KNOWLES et al., 2016). Quando um bacteriófago encontra seu hospedeiro bacteriano, ele se liga por meio dos receptores nas fibras da cauda aos receptores da célula hospedeira, que podem incluir proteína, oligossacarídeo, ácido teicóico, peptidoglicano ou lipopolissacarídeo (LENSKI, 1988). Inicialmente essa ligação é reversível, em seguida torna-se irreversível quando o fago injeta seu DNA na célula hospedeira (HANLON, 2012).

Os fagos líticos se replicam nas células bacterianas e se espalham matando as células. Fagos temperados podem se replicar e se espalhar integrando suas informações genéticas ao genoma bacteriano (TINOCO, 2017).

O ciclo lítico, ou também conhecidos como virulentos, apresentam taxas de replicação altas, fazendo com que ocorra um acúmulo de vírus e proteínas, ocasionando a lise bacteriana seguida da liberação dos bacteriófagos (MAURICE et al., 2013).

Ainda no ciclo lítico dos bacteriófagos o DNA injetado vai assumir a maquinaria metabólica da célula hospedeira direcionando a bactéria à fabricação e montagem de novos vírus (HANLON, 2012). O bacteriófago vai sintetizar uma enzima denominada holina que degrada a membrana citoplasmática, permitindo que as endolisinas promovam a lise da parede celular. A célula hospedeira vai se romper liberando em média mais de 100 novos vírions (HANLON, 2012).

A síntese de holina define o momento da liberação da progênie de fago. Os fagos recém-liberados continuam infectando células bacterianas hospedeiras suscetíveis até que todas as bactérias tenham sido mortas (HANLON, 2007). O tempo entre a ligação inicial do fago e a lise da célula com a liberação resultante da progênie do fago é conhecido como período latente. Esse período de latência do fago pode ocorrer da ordem de 20-30 minutos e o processo de replicação do fago é muito rápido (HANLON, 2012).

No ciclo lisogênico o que ocorre é a incorporação do DNA injetado no genoma da célula hospedeira ou ele vai existir dentro da célula como um plasmídeo. A célula bacteriana continua desempenhando suas funções normais, até mesmo a replicação,

momento em que o genoma viral (conhecido como profago) também será replicado. Desta forma, todas as células-filhas também vão apresentar o material genético que constitui o profago (HANLON, 2012).

Quando no ciclo lisogênico podem ser encontrados no estado latente, tendo o material genético integrado ao da célula hospedeira. No ciclo lítico o fago fará uso do arsenal bacteriano com objetivo de produzir material genético e proteínas resultando em novos fagos (MANN, 2005; WEBBER-DABROWSKA et al., 2000).

Endolisinas (ou lisinas) são enzimas altamente evoluídas produzidas por bacteriófagos cuja função é digerir a parede celular bacteriana para a liberação da progênie do fago. Após a replicação dentro de seu hospedeiro bacteriano, o bacteriófago precisa sair da bactéria para disseminar seu fago progênie. Os fagos de DNA de fita dupla desenvolveram um sistema lítico para enfraquecer a parede celular bacteriana, levando a lise bacteriana (FISCHETTI, 2010).

As endolisinas são produzidas no final do ciclo de vida do fago lítico, acumuladas no citoplasma da célula hospedeira até serem ativadas, liberando o fago da progênie pela clivagem de ligações de peptidoglicano (FISCHETTI, 2010). Estas enzimas apresentam uma estrutura globular ou modular (WALMAGH et al., 2013).

As lisinas apresentam especificidade que baixa a chance de resistência bacteriana, e sua capacidade de matar patógenos colonizadores nas superfícies mucosas, uma capacidade que antes não estava disponível, as fazem anti-infecciosos ideais (FISCHETTI, 2010), em uma época que nos deparamos com a alta resistência bacteriana.

A interação entre lisina com a membrana externa das bactérias Gram-negativas fica impedida, enquanto a interação entre lisinas e bactérias Gram-positivas ocorrem, porque as lisinas são capazes de entrar em contato direto com os carboidratos e peptidoglicanos da parede celular quando adicionadas externamente (FISCHETTI, 2010).

A partícula viral carrega apenas a informação genética necessária para que ocorra a replicação de seu ácido nucléico e síntese das proteínas necessárias para sua reprodução (ALBERTS et al., 1989). Com a ausência de células hospedeiras vivas, os vírus não terão capacidade de produzir sua progênie (ORLOVA, 2012) sozinhos.

Os bacteriófagos não apresentam organelas e citoplasma, sendo dependentes das células hospedeiras para poder se multiplicar. Os bacteriófagos no ciclo lítico de replicação levam a liberação de inúmeras cópias de fago, através da lise celular, e que irão infectar outras bactérias (VISPO, PUCHADES 2001).

A liberação de fagos novos se dá na etapa lítica final, através de um sistema de lise dupla onde o peptidoglicano é hidrolisado através de autolisinas que irão acometer a porção da parede celular enquanto a membrana citoplasmática vai sendo destruída por holinas (ACKERMANN, 1999). Em torno de 1000 novos fagos são liberados para infectar novas células neste momento (HANLON, 2007).

1.4 Bacteriófagos *versus* Antibióticos

Associado ao tratamento endodôntico os antibióticos também podem ser explorados de inúmeras formas: de forma local, sistêmica e profilática. Localmente ou intracanal podem ser usados no formato medicamentoso (ABBOTT et al., 1990).

Sistemicamente indicados a pacientes que apresentem sinais locais de infecção, temperatura corpórea alta e mal-estar. O seu uso indiscriminado não é encorajado. Para que os medicamentos antibióticos continuem sendo eficazes em situações mais graves o uso de medicamentos de espectro amplo deve ser limitado (ABBOTT et al., 1990).

O número crescente de patógenos resistentes a antibióticos associado ao fato de termos opções cada vez mais escassas de antibióticos para o tratamento de pacientes, fez com que muitos pesquisadores buscassem métodos alternativos para o controle de infecções, buscando respostas e alternativas na terapia fágica (MARKS et al., 2000).

No final do século 19 os efeitos dos bacteriófagos foram notados pela primeira vez. Hankin percebeu que as águas dos rios Jumna e Ganges localizados na Índia, apresentavam ação antibacteriana. Twort propôs a teoria de que tal atividade antimicrobiana desempenhada pelos bacteriófagos poderia ser devido a um vírus, logo após d'Herelle propôs a mesma tese (DUCKWORTH, 1976).

D'Herelle juntamente com cientistas da Geórgia (ex-URSS) criaram um Instituto para estudar o uso de bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas e suas propriedades, isso uma década antes da descoberta da penicilina.

Métodos eficientes de produção de penicilina foram desenvolvidos por Florey e Chain baseado no trabalho realizado por Alexander Fleming no fim dos anos 1920. A penicilina vista como resposta às infecções bacterianas mostrou-se eficaz no combate a uma série de espécies bacterianas (STREPTOMYCIN IN TUBERCULOSIS TRIALS COMMITTEE, 1948).

Embora a penicilina tenha sido descoberta em meados finais dos anos 20 (STREPTOMYCIN IN TUBERCULOSIS TRIALS COMMITTEE, 1948). No final do

ano de 1930, os antibióticos foram descobertos. Os antibióticos foram tão eficientes e quase extinguiram os estudos sobre o uso de fagos. As bactérias sofreram adaptações ao longo do tempo, permitindo que elas se tornassem resistentes às drogas mais potentes utilizadas na medicina moderna (ORLOVA, 2012).

O surgimento de patógenos modificados, acabou levando a grandes problemas no tratamento de pacientes em hospitais (COELHO et al., 2004; BURROWES et al., 2011).

Preparações de bacteriófagos e seu uso tem sido observados como relativamente livre de efeitos colaterais, embasados em ensaios clínicos e em trabalho relatado no Leste Europeu (KUTTER et al., 2010; ABEDON et al., 2011), o que reforça positivamente o seu uso e sua pesquisa. Entretanto, mais dados de ensaios clínicos em humanos regulamentados são essenciais (BUCKLING et al., 2012).

As lisinas são específicas somente para as espécies (ou subespécies) de bactérias das quais foram produzidas. Por exemplo, as enzimas produzidas pelo fago pneumocócico matam os pneumococos e as enzimas produzidas a partir do fago estreptocócico matam certos estreptococos. As lisinas dos fagos são o culminar de milhões de anos de desenvolvimento pelo bacteriófago em sua associação com as bactérias (LOEFFLER et al., 2001; NELSON et al., 2001).

Na maioria dos casos, essas enzimas apresentam baixa atividade ou são difíceis de produzir em grandes quantidades, e assim como os bacteriófagos são específicas, ao contrário dos antibióticos, que apresentam amplo espectro e levam a morte de muitas bactérias diferentes incluindo algumas bactérias benéficas (FISCHETTI, 2010).

Em relação a terapia antibiótica convencional os fagos e suas endolisinas derivadas possibilitam muitas vantagens que variam desde sua abundância no ambiente até de seu alto grau de especificidade permitindo que qualquer resistência desenvolvida seja superada, apenas mudando o fago (NAKONIECZNA et al., 2015).

Ao contrário do que ocorre com os antibióticos, os fagos e suas lisinas a partir do momento que iniciam uma resposta imune no paciente, diminuem sua eficiência e aumentam a depuração do corpo (ELBREKI et al, 2014). Para tentar reduzir essa resposta, as preparações podem ser combinadas com excipientes adicionais que podem mascarar o fago ou endolisina do sistema imunológico, como o polietilenoglicol (FENTON et al, 2010).

Theuretzbacher (2012) reforça que os bacteriófagos são bastante específicos para as bactérias que infectam e são improváveis de causar problemas ao matar bactérias reconhecidas como benéficas, ao contrário do que ocorre com os antibióticos químicos.

O problema da resistência bacteriana frente ao uso de antibióticos vem aumentando. Atualmente nos deparamos com casos em que alguns patógenos importantes são resistentes a maioria dos antibióticos disponíveis. Como por exemplo, estudos afirmaram que estamos próximos do fim da era dos antibióticos em relação a algumas bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (LIVERMORE, 2003; COELHO et al., 2004).

Outro exemplo, a linezolida foi trazida à clínica em 2000, tendo como alvo o *Staphylococcus aureus* multirresistente (MRSA), uma das bactérias mais preocupantes e resistentes a antibióticos. Passados 14 anos de seu desenvolvimento, a resistência clínica à linezolida apareceu em apenas 1–2 anos (MUTNICK et al., 2003).

Segundo DiMasi e colaboradores (2003) e Spellberg e colaboradores (2004) o custo para se fazer um medicamento novo gira em torno de US\$ 400-800 milhões, fora o tempo de descoberta, processamento e lançamento, que pode chegar a uma média de 8 anos.

A ex-União Soviética e a Europa Oriental mantiveram o uso dos fagos para tratamento de infecções nos últimos 70-80 anos, acumulando uma grande quantidade de conhecimento clínico disponível para nós hoje. No Ocidente notamos que os antibióticos foram a preferência à terapia fágica (HANLON, 2012).

Farmacocineticamente falando os medicamentos sistêmicos de via oral são normalmente absorvidos pela corrente sanguínea, o medicamento é metabolizado e removido do sistema, levando a uma queda nos níveis sanguíneos, sendo necessário doses e mais doses sequencialmente para que este fármaco se encontre no organismo a níveis suficientes para o tratamento (HANLON, 2012).

Para que ocorra a morte celular, alguns antibióticos possuem uma certa necessidade de que haja crescimento celular. Quase todos antimicrobianos apresentam-se mais eficazes em eliminar células de crescimento rápido. Temos como exemplo a penicilina e a ampicilina que não matam as células que não possuem crescimento, assim, a taxa de morte se torna proporcional à taxa de crescimento (LEWIS, 2001). Costerton e colaboradores (1999) afirmam que o crescimento lento do biofilme contribui para sua resistência à morte.

Quando abordamos a farmacocinética dos bacteriófagos sabemos que após a dose inicial de fago, o número de vírus no sistema aumentará à medida que se replicam nos patógenos bacterianos infectantes, aumentando até que todas as células hospedeiras sejam destruídas. Sendo assim, facilitaria até na administração e controle quanto ao uso do fago frente a algumas infecções, bastando apenas uma dose única (HANLON, 2012).

A terapia fágica existente permite níveis iniciais de dosagem muito baixos (MARZA et al., 2006; WRIGHT et al., 2009), reduzindo desta forma os custos e o potencial de efeitos colaterais (BUCKLING et al., 2012) podendo em breve serem mais acessíveis e seguros a população.

Como estamos constantemente em contato e expostos a estes vírus, devido a abundância dos bacteriófagos, explica-se o fato de que há poucas ou nenhuma reação adversas ou alérgicas associadas ao seu uso terapêutico, de acordo com experiência clínica na ex-União Soviética e na Europa Oriental (HANLON, 2012).

No começo, logo após sua descoberta, os antibióticos eram vistos como medicamentos milagrosos, salvando milhões de vidas. Nos anos de 1970, já se viam cepas altamente resistentes a bactérias causadoras de doenças. A cada década que passava o problema ia se agravando e finalmente foi reconhecida a resistência bacteriana como uma crise global de saúde. Para termos uma ideia, o tempo de espera para se desenvolver novos antibióticos é muito maior do que se comparado ao tempo de espera para as bactérias desenvolverem mais resistência (ABEDON et al., 2011).

Comprovando a tese da resistência bacteriana, o Instituto de Imunologia de Hirsfeld (Wroclaw, Polônia) trabalhou com hospitais e médicos locais para tratar pacientes que não apresentavam resposta aos antibióticos, coletando e publicando uma série de artigos com dados extensos sobre vários pacientes (KUTTER et al., 2010; SLOPEK et al., 1987), reforçando novamente o uso da terapia fágica frente a resistência bacteriana a qual estamos vivendo nos dias atuais.

A terminologia de MDR (multirresistente) agora é complementada com XDR (extremamente resistente a drogas) e em alguns casos até de PDR (pan-resistente a drogas; resistente a todos os antibióticos conhecidos) (THEURETZBACHER, 2012), tais resistências bacterianas tendem a progredir deixando-nos com opções escassas em relação a antibioticoterapia. Portanto, a terapia fágica mostra-se como uma luz no fim do túnel, uma opção próspera como resposta a estas resistências.

Quando medicamentos são lançados no mercado, estes devem satisfazer as autoridades regulatórias nos quesitos relacionados à sua qualidade, segurança e eficácia. Principalmente à segurança, porque o produto não deve causar danos ao paciente. Embora haja certa garantia da ausência de efeitos colaterais ou reações adversas relatadas em publicações provenientes do antigo bloco soviético em relação a terapia fágica, é importante demonstrar que seu uso é seguro (HANLON, 2012).

Vemos que o uso de bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas, ainda necessitam de mais estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, com objetivo de servir como opção alternativa de tratamento em situações nas quais a antibiótico-terapia não se mostra mais eficaz ou se apresenta resistente a determinadas cepas bacterianas. Com a chegada da era antimicrobiana e seu sucesso, as pesquisas que envolviam fagos e o seu uso clínico ficaram limitadas essencialmente a ex-União Soviética (HANLON, 2007).

D'Herelle encarregou-se de boa parte das pesquisas que buscavam compreender a natureza dos fagos, e também apresentou terapias baseadas neles. Em 1919 abordou a febre tifóide em galinhas e disenteria humana, como resultado de seu estudo as aves que foram tratadas com o uso de bacteriófagos mantiveram-se vivas comparado com as aves do grupo controle em que 75% destas morreram (HARPER et al., 2014).

Em 1919, o primeiro ensaio clínico de Fase I com bacteriófagos foi realizado por D'Herelle, em que o produto de terapia de fágica foi testado nele mesmo e em seus colegas de trabalho, previamente a administração a seus pacientes que sofriam de disenteria. Sendo este o primeiro uso bem-sucedido de bacteriófagos no tratamento de infecções bacterianas em humanos (HANLON, 2012).

Outra terapia realizada por D'Herelle também foi bem-sucedida, para o tratamento da disenteria em um menino de 12 anos (HARPER et al., 2014; ORLOVA, 2012) e após em outras quatro crianças com mesma sintomatologia (HARPER et al., 2014).

Bruyoghe e Maisin em 1921 foram os primeiros a publicar o uso de fagos em humanos, o relato se referia a seis pacientes com infecções de pele estafilocócicas e que foi bem-sucedido (HARPER et al., 2014).

Porém o primeiro ensaio formal de segurança de Fase I em bacteriófagos relatado na literatura ocidental foi conduzido por Bruttin e Brussow em 2005, em que 15 voluntários saudáveis receberam *E. coli* fago T4, em diferentes doses, e placebo na água de beber. Como resultado não houve nenhuma reação atribuível à administração de fago (BRUTTIN et al., 2005).

A proximidade existente entre células bacterianas no biofilme proporciona que haja uma troca de elementos genéticos entre elas, inclusive a transferência de resistência aos antibióticos (PLUTZER et al., 2018). Neste artigo de Plutzer e colaboradores (2018) demonstraram uma proporção considerável de isolados de enterococos mostram resistência adquirida às tetraciclinas e resistência intrínseca à clindamicina.

Com o advento dos antibióticos químicos eficazes e seguros, chegou também ao fim a primeira era da terapia com bacteriófagos. Os antibióticos tornaram-se mais facilmente comercializados e aprovados, podendo ser recomendados com pouco menos conhecimento das bactérias específicas envolvidas. Com o passar do tempo estes fatores também contribuíram para que ocorresse a crise de resistência aos antibióticos (STREPTOMYCIN IN TUBERCULOSIS TRIALS COMMITTEE, 1948).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do uso de bacteriófagos em biofilmes de *E. faecalis* como auxiliar de desinfecção do sistema de canais radiculares e sistemas de túbulos dentinários, apontados em revisão de literatura.

2.2 Objetivos Específicos

Estabelecer o potencial do uso de bacteriófagos no combate a infecções endodônticas com predomínio de *E. faecalis*, através da análise da literatura existente.

Realizar estudo piloto em dentes humanos unirradiculares extraídos e com canais infectados por *E. faecalis*, através da visualização do biofilme por meio de bioluminescência e pela Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4. PROJETO PILOTO

O projeto piloto desenvolvido para o **Uso de bacteriófagos de *Enterococcus faecalis* como estratégia auxiliar de desinfecção do sistema de canais radiculares e sistema de túbulos dentinários**, foi encaminhado à Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) (COMPESQ).

As amostras e o preparo dos canais radiculares foram realizados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A cultura bacteriana, sua inoculação, análise microbiológica, meio de bacteriófagos foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Seleção e Preparo das Amostras

Para este estudo 9 dentes humanos, de canal único e maduros foram selecionados, estes dentes compunham um banco de dentes previamente existente, não sendo necessário extrações prévias e autorização de pacientes para sua utilização neste projeto piloto. Os mesmos foram selecionados, higienizados, receberam preparo químico-mecânico, foram armazenados em água destilada e autoclavados até serem usados.

Os critérios para que os dentes selecionados fossem incluídos no estudo foram: canais predominantemente retos, que apresentassem diâmetros similares e que apresentassem ápices completamente desenvolvidos. Esta seleção foi realizada por três operadores, previamente treinados e calibrados. Os critérios de exclusão foram dentes que já possuíam tratamento ou já tivessem sido manipulados endodonticamente, dentes com presença de reabsorções dentárias, fraturas de um modo geral, bifurcação dos canais radiculares, calcificações pulpare e dilacerações apicais.

4.1.2 Análise Estatística

A análise estatística não foi determinada neste estudo piloto. Tinha-se como objetivo dar seguimento as pesquisas, a qual abordará um cálculo amostral e um “n” mais significativo. Estas nove amostras foram determinadas casualmente, apenas com a

finalidade de delineamento e estratégias para estudos futuros. Em virtude dos acontecimentos mundiais atuais este breve retorno não foi possível.

4.1.3 Limpeza e Esterilização dos Dentes

Com as amostras selecionadas, a limpeza externa dos dentes foi realizada por meio de raspagem radicular, com cureta periodontal tipo *Gracey* nº 1/2, 3/4 e 5/6 (*Neumar Instrumentos Cirúrgicos Ltda.* - Brasil), promovendo a remoção do ligamento periodontal remanescente que se encontrava aderido às raízes dos dentes. Após a raspagem radicular, as amostras foram lavadas em água corrente, pelo tempo de 1 minuto. A secagem dos dentes foi realizada em temperatura ambiente.

Os dentes foram descoronados, ou seja, suas coroas foram removidas abaixo da junção amelocementária, perpendicular ao longo eixo do dente com o auxílio de um disco diamantado (*KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda.*, Barueri, São Paulo, Brasil) em peça reta de mão (*Kavo Kerr*) de modo que todas as raízes mantivessem o mesmo comprimento de 16 mm.

Também com o auxílio de peça reta de mão, foram realizados sulcos no sentido longitudinal das faces vestibular e palatina das amostras, cuidando para que o interior do canal radicular não fosse atingido, mas com profundidade suficiente para que no fim do experimento pudessem ser clivados com maior facilidade em duas hemisecções. Para a confecção dos sulcos, os mesmos discos diamantados dupla face foram usados (*KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda.*, Barueri, São Paulo, Brasil). Para que posteriormente pudessem ser analisados microbiologicamente, através de análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), e para análise com fluoróforo de Qubit para bioluminescência e para solução contendo bacteriófagos.

Para a exploração dos canais radiculares, limas manuais do tipo K (*Dentsply Sirona Maillefer*, Catanduva, São Paulo - SP) de 21mm, de tamanho #10, calibradas em 16mm foram utilizadas. Para o preparo químico-mecânico das amostras utilizamos limas mecanizadas, *Protaper Next* x1 (0.17/.04) e x2 (0.25/.06) (*Dentsply Maillefer*, Catanduva, São Paulo - SP) no comprimento de trabalho de 16mm, com auxílio de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (*Iodontec Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda.*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil), com EDTA trissódico a 17% (*Iodontec Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda.*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) por um tempo de 5 minutos com o propósito de remover a *smear layer*, e com

irrigação final realizada com hipoclorito de sódio a 2,5%. Posterior secagem do canal das amostras com pontas de papel absorvente esterilizadas previamente, compatíveis com o calibre das amostras (Tanari Indústria Ltda., Manaus, Amazonas, Brasil).

Em seguida, os dentes descoronados foram secos em temperatura ambiente e após estarem secos posicionados em microtubos de 1,5 ml (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com a porção correspondente a cervical para cima, para minimizar os riscos de contaminações e realizar as trocas de meio. Um orifício foi realizado na região central das tampas dos microtubos com auxílio de instrumentos aquecidos em chama, na qual os dentes foram posicionados e fixados com cianoacrilato (SuperBonder cola plástica - Loctite, São Paulo, Brasil).

Em uma lateral do microtubo próxima ao orifício principal (central), um pequeno orifício foi realizado para as trocas do meio de cultura, este foi realizado com agulha descartável para irrigação (Injex 21G, Ourinhos, São Paulo, SP). No conjunto microtubos e dentes, uma pequena quantidade de Fita Micropore (Nexcare de 25MM X 1,35M, Sumaré, SP, Brasil) envolvendo as tampas e os microtubos, foi colocada com objetivo de diminuir uma possível contaminação.



Figura 3 – Amostras nos microtubos, envoltos por micropore com inserção de meio cultura por orifício lateral

Os microtubos com os dentes foram acomodados em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon hills, IL, EUA) embaladas individualmente em embalagens para autoclave (Hospflex, Sorocaba, São Paulo, Brasil), e posteriormente esterilizados em autoclave Vertical (Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul). O tempo de esterilização das amostras ocorreu em um ciclo de 15 minutos à temperatura de 120°C.

Nos microtubos com as amostras, a cultura de *E. faecalis* foi adicionada de forma igualitária através dos orifícios realizados.



Figura 4 – Disposição das amostras em caixa de polipropileno

4.1.4 Preparo da Cultura e Inoculação

4.1.4.1 *Enterococcus faecalis*

O *E. faecalis* foi a cepa bacteriana selecionada para a realização deste trabalho (ATCC 29212). O preparo do inóculo foi realizado a partir de estoque -20, cultivado em uma alíquota de 200ul em 3ml de caldo BHI, incubados por um período de 24 horas. Em seguida uma alíquota de 200ul era retirada e recultivada em novo caldo de BHI de 3ml, e incubados novamente por 24 horas.

A partir do preparo do inóculo, a contagem inicial do mesmo foi realizada através de diluição feita até a 10^{-9} . Na caixa de diluição, foi adicionada 450ul de solução salina em 9 poços, cada um correspondente a cada diluição. No primeiro poço foi acrescentado 50ul do inóculo inicial. Em seguida, foi realizada diluição seriada, em que 50ul do primeiro poço era passado para o segundo poço, e assim sucessivamente, homogeneizando o caldo. Após a diluição seriada, 10ul de cada diluição eram inoculados através da técnica de gota, em triplicata.

A cultura de *E. faecalis* foi adicionada de forma igualitária a cada amostra, através do orifício na tampa dos microtubos para que ocorresse o desenvolvimento de biofilme. As estirpes de *E. faecalis* foram cultivadas em caldo de infusão de cérebro coração (BHI) por 24 horas posicionado em shaker, seguida de realização de gram para verificar se houve

algum tipo de contaminação, e após confirmação foi mantida em estufa a 37° C até seu uso.

Os *E. faecalis* foram cultivados no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC - RS) em meio BHI contendo 1% de tripticase (BBL, Cockeysville, MD), 1% de proteose peptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% de extrato de levedura (Difco, Detroit, MI), 0,5% de cloreto de sódio, 5mg/mg de hemina e 0,5% mg/ml de vitamina K suplementado com 0.2% de glicose, a 37°C (Takahashi et al., 1997) durante 24horas (PUC-RS).

4.1.4.2 Bacteriófagos

Os bacteriófagos para *E. faecalis* foram disponibilizados pelo Laboratório de Microbiologia da Medical University of Łódź, na Polônia, para realizar o projeto piloto, e foram diluídos no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

Cepas de *E. faecalis* foram testadas contra o fago para determinar o intervalo de hospedeiros fágicos. Cinco microlitros da suspensão dos fagos (1×10^7 unidades formadoras de placa [PFU]/ml) foram depositadas em uma placa, esta previamente inoculada com as bactérias específicas para este experimento. Seguidas de diluições de 10 vezes do material do fago até 10^{-5} , mantendo 1 Grupo Controle. Sete tubos foram preparados com uma concentração de fagos de 10^{-2} .

As 5 amostras do Grupo 3 (Teste), receberam 1,5mL dessa diluição de 10^{-2} , ou seja, até a altura que estas amostras ficassem submersas por diluições do fago visualmente. Após, os dentes eram levados à estufa novamente a uma temperatura de 37° Celsius, permanecendo por um período de 48 horas.

4.1.5 Classificação dos Grupos de Tratamento e Inoculação das Amostras

Numerados do 1 ao 9, aleatoriamente, disponibilizados conforme os seguintes grupos:

GRUPO 1: Controle Positivo (n=3): Amostras esterilizadas e inoculadas com cepas para *E. faecalis* + PQM + Fluoróforo Qubit + MEV.

GRUPO 2: Controle negativo (n=1): A amostra não foi inoculada com *E. faecalis*. PQM + amostra esterilizada + procedimento experimental (receberam caldo BHI sem *E.*

faecalis) . Posterior comparação com os demais grupos para ação do fluoróforo Qubit + MEV.

GRUPO 3: Grupo Teste (n=5): PQM+ caldo de BHI para *E. faecalis* + bacteriófagos (48hrs) + ação do fluoróforo Qubit + MEV.

Para que houvesse contaminação dos dentes, dentro do canal, em cada amostra foi colocado uma quantidade correspondente a 100uL do inóculo inicial, acrescidos de caldo BHI até que toda a extensão do dente ficasse submersa. No grupo correspondente ao controle negativo foi introduzido apenas caldo de BHI, sem a presença de *E. faecalis*. Após, a caixa de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon hills, IL, EUA) era fechada com os microtubos contendo as amostras dentro, e envolta com plástico filme, levada a incubação em estufa a 37°C, até nova troca de meio.

A renovação do meio de cultivo era realizada a cada 2 dias através do orifício lateral no dente em capela de fluxo laminar, para que tivéssemos áreas de trabalho estéreis para a manipulação de materiais biológicos, evitando que as amostras pudessem sofrer contaminação do meio ambiente, garantindo a segurança no momento da manipulação das mesmas. O meio cultivado era removido com auxílio de uma seringa descartável e agulha descartável, para que em seguida novo meio fosse inserido.

A troca do meio de cultivo era realizada com auxílio de agulhas (Injex 21G, Ourinhos, São Paulo, SP - Dental Web, Porto Alegre, Rio Grande do Sul) e seringas descartáveis luer lock (Injex, 5ml, Ourinhos, São Paulo, SP - Dental Web, Porto Alegre, Rio Grande do Sul). Todo caldo de BHI ou 2/3 de sua quantidade era removido através do orifício lateral nas tampas dos microtubos e descartado posteriormente, para que um novo meio de cultivo fosse inserido. As amostras em seguida eram novamente embaladas em plástico filme e levadas a estufa a uma temperatura de 37°C por 48 horas, até nova troca por um período de 28 dias corridos (ESTRELA et al, 2009) para que ocorresse o desenvolvimento de biofilme, com renovação do meio de cultivo no período de 3 dias por semana.

Durante as trocas de meio de cultivo, uma gota do material coletado do interior dos microtubos era disposta em placa ágar sangue conforme as 9 amostras, e levados à estufa a 37°C por um período de 48 horas, para posterior avaliação visual e contagem bacteriana, verificando se houve contaminação em alguma amostra, através de coleta para análise de Gram.

A partir das placas de ágar sangue, a coloração de gram era realizada com auxílio de uma alça aquecida e estéril, depositadas em lâminas de vidro e coradas, para que em seguida pudessem ser analisadas em microscópio (objetiva de 100x) para observar se houve presença de bactérias, do tipo estafilococos, sem presença de contaminação, com ausência de colônias diferentes. Todas as etapas laboratoriais eram realizadas pela técnica do laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), enquanto nós alunas acompanhávamos e aprendíamos os processos.

Após o período de 28 dias de trocas de meio, antes de realizar a hemisseção dos dentes, as amostras correspondentes ao grupo 3 (Teste) e Grupo 2 receberam solução contendo bacteriófagos, após a solução do meio de cultura para *E. faecalis* ser removida parcialmente (equivalente a 2/3 do líquido total) ou sua totalidade.

Ao fim do período de 48 horas em contato com os bacteriófagos para *E. faecalis*, parte das amostras foram seccionadas com auxílio de um instrumento de ponta estéril em capela de fluxo laminar. Das amostras hemisseccionadas, uma hemisseção era correspondente ao grupo Controle Positivo e outra correspondente ao Grupo com bacteriófagos aplicados (Grupo 3 - Teste). Estas duas amostras mencionadas receberam fluoróforo Qubit para verificar através da bioluminescência a contaminação no interior dos canais radiculares pelas cepas bacterianas e a ação dos bacteriófagos nos mesmos. O Controle Negativo também recebeu fluoróforo Qubit.

4.2 Bioluminescência

O Qubit Protein foi escolhido para a realização deste estudo. Foi realizado mapeamento microbiológico inicial de 2 das amostras hemisseccionadas (uma do grupo Controle Positivo e outra do Grupo (3 – Teste) com bacteriófagos aplicados) por bioluminescência para verificar a contaminação no interior dos canais radiculares pelas cepas bacterianas e a ação dos bacteriófagos nos mesmos.

O Fluoróforo (Q33211, Qubit Protein Assay, Invitrogen, Eugene, USA) foi aplicado em duas hemisseções e visualizados pelo sistema ReVeal (Design for Visions, New York, USA). Este sistema consiste em uma lupa de 2,5x de aumento, com fotóforo UV de 450 nm de comprimento de onda. A visualização das amostras hemisseccionadas foram realizadas em campo totalmente escuro, apenas com iluminação ultravioleta emitida pelo aparelho.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras para bacteriófagos permaneceram overnight (24 horas) em solução de glutaraldeído a 2,5% (Glicolabor – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Através da imersão em soluções de acetona em concentrações de 10, 30, 50, 70, 90 até 100% foram desidratadas e secas usando uma ponta de papel (Pontas de papel absorventes 15-40 e 45-80, Diadent/TDK, Dental Web, Porto Alegre- RS), em uma superfície com a porção do canal voltada para cima.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC – RS). As amostras foram cobertas com aproximadamente 30nm de espessura de liga ouro/paládio (Emitech K650 Sputter Coater, London, England), em máquina Sputter Coater BAL-TEC SCD 005 (BAL-TEC AG, Liechtenstein, Alemanha), em que a deposição da liga ocorreu nas amostras a um nível de vácuo de aproximadamente 5×10^{-2} mbar.

As observações em microscopia eletrônica de varredura (XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands) foram realizadas com ampliações de 500x, 2000x, 5000x e 10000x.

4.4 Resultados

Parte dos canais das amostras foram observados e outra parte não, os motivos se justificaram pela falta de tempo no dia, devido ao curto tempo de horário de reserva do laboratório, sendo estes descartados e também por conta das discrepâncias encontradas na primeira análise à Microscopia de Varredura.

Duas amostras hemisseccionadas (uma do grupo controle positivo e outra do grupo com bacteriófagos aplicados) receberam fluoróforo Qubit para bioluminescência, afim de verificar a contaminação no interior dos canais radiculares pelas cepas bacterianas e a ação dos bacteriófagos. O Fluoróforo (Q33211, Qubit Protein Assay, Invitrogen, Eugene, USA) - foi aplicado nas hemisseccções e visualizado pelo sistema ReVeal (Design for Visions, New York, USA). Este sistema corresponde a uma lupa de 2,5x de aumento, que apresenta um fotóforo UV de 450 nm de comprimento de onda. O teste para bioluminescência destes fluoróforos foi realizado em local totalmente escuro, contando somente com a iluminação ultravioleta emitida pelo aparelho ReVeal.

Na hemisseccção radicular correspondente ao Grupo Controle Positivo notamos a bioluminescência do *E. faecalis* na total extensão do canal radicular. A hemisseccção

pertencente ao grupo de tratamento com fagos apresentou uma diminuição da bioluminescência para *E. faecalis*, retomando a justificativa anteriormente mencionada correspondente a ação positiva e efetividade dos fagos frente a eliminação dos *E. faecalis*.

O Qubit Protein mostrou-se como um fluoróforo capaz de delimitar de forma precisa a região correspondente a área contaminada por *E. faecalis*, destacando melhor a região correspondente ao canal radicular das amostras. Na amostra correspondente ao grupo Controle Negativo, não notamos fluorescência, ou seja, frente a ausência de bactérias no canal radicular o fluoróforo não reflete luz (emite fluorescência).

Não existem referências que mencionem o Qubit Protein juntamente com biofilmes endodônticos. Desta forma, se faz necessário investir e investigar seu uso dentro da Odontologia, principalmente na Endodontia frente a biofilmes endodônticos, em busca de comprovar sua eficácia (KUO et al., 2019).

As observações em MEV foram visualizadas na altura dos terços cervicais, médios e apicais dos canais hemisseccionados. Foram realizadas por um examinador treinado que já possuía experiência, focando nas características e localização do biofilme (BALDASSO et al., 2012). As áreas mais representativas de cada terço foram gravadas, em formato TIFF em resolução de 300 dpi.

Os padrões mais observados à MEV, foram os padrões de cadeias curtas a médias, caracteristicamente ovaladas, lembrando cachos de uva. Frente a ação dos bacteriófagos específicos para *E. faecalis*, notamos que este padrão ovalado rompia-se, ficando com uma característica de um *E. faecalis* murcho, lembrando também um grão de uva “murcho”. Não era notável o contorno dos *E. faecalis*, significando e reforçando que estes estivessem mortos.

Na amostra correspondente ao Controle Positivo, observamos que mais *E. faecalis* deveriam estar presentes no canal principal, principalmente pelo fato de que esta amostra não recebeu nenhum tipo de tratamento, porém nos túbulos dentinários notamos uma grande presença desta bactéria.

Na amostra correspondente ao Controle Negativo, não detectamos contaminação, nem presença de bactérias. Apenas estruturas globulares que não apresentam correlação com as bactérias.

Um ponto importante do nosso estudo piloto, está correlacionado uma das amostras analisadas em MEV do Grupo 3, que apresentou-se com uma quantidade grande

de bactérias, mostrando maior similaridade com o que deveria ser a amostra correspondente ao Controle Positivo.

As bactérias de *E. faecalis* para o Controle Positivo, deveriam apresentar-se mais próximas da forma como na amostra do Grupo 3, com os discos diploides bem definidos. Como principal hipótese para justificativa desta observação, pode estar correlacionada com erro na fixação com glutaraldeído, no qual as amostras permaneceram por apenas 24 horas, podendo terem permanecido por mais tempo, comprometendo a fixação da peça e posterior análise da mesma em MEV, levantando tais dúvidas mencionadas, e também talvez por não estarem em íntimo contato com a solução contendo bacteriófagos.

A utilização do glutaraldeído devido às suas propriedades de penetração e por precipitar prontamente as substâncias proteicas da célula, assegurando ótima preservação da ultraestrutura, como fixador para microscopia eletrônica pode ser recomendado para a boa parte dos tecidos animais e vegetais. Amostras que são bem-preparadas apresentam-se altamente higroscópicas e necessitam ser fotografadas imediatamente no MEV. O tempo de ação do fixador pode variar de algumas horas a vários dias, quando o objetivo é aumentar a rigidez do espécime (DE CASTRO, 2002).

A microscopia eletrônica se mostra como uma ferramenta importante utilizada na análise da morfologia do fago e que deu início ao processo de classificação de vírus (ORLOVA, 2012). É importante avaliar e analisar técnicas de observação com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura, coletando dados pertinentes de células bacterianas agregadas em uma matriz extracelular na parede do canal radicular.

Ainda a respeito da análise com MEV, na entrada dos canais, correspondentes ao terço cervical das amostras do Grupo 3 havia maior presença de *E. faecalis*, no terço médio para apical notou-se uma quantidade menor, isso talvez porque a parte de cima, correspondente a cervical não estivesse totalmente submersa em contato com o meio.

Não erradicou-se totalmente os *E. faecalis*, mas o estudo mostrou resultados positivos e promissores para que possa resultar em maior sucesso futuro em experimentos *in vitro*, para que também possamos evoluir para os tratamentos endodônticos *in vivo*, em algum momento.

À análise microscópica notamos que os bacteriófagos em contato com o canal radicular infectado com *E. faecalis* possui capacidade de levar a lise de suas células. A parede celular dos *E. faecalis* apresentaram-se rompidas sinalizando sua morte. Os *E. faecalis* apresentavam-se com formato ovalado, podendo ser vistos isoladamente, aos

pares, em cadeias curtas ou até mesmo muito longas, sendo mais comuns as cadeias curtas e médias.

Outro ponto importante que pudemos destacar a respeito dos resultados do projeto piloto com bacteriófagos para *E. faecalis* é que também notamos que sua ação não ficou limitada apenas a extensão do canal principal, havendo também ação sobre as bactérias no interior dos túbulos dentinários. O que atualmente vemos como ponto positivo por serem regiões que não conseguimos chegar com instrumentos endodônticos para realizar uma limpeza mecânica, e a ação dos irrigantes utilizados durante o preparo químico também fica limitada. Da mesma forma, a medicação intracanal padrão ouro, que é o hidróxido de cálcio não consegue chegar nas regiões estreitas dos túbulos dentinários.

Estudos revelaram que *E. faecalis* é capaz de penetrar nos túbulos dentinários, e às vezes até em profundidade (EVANS et al., 2002). Essa característica permite que o *E. faecalis* escape da ação de irrigantes usados durante o preparo químico-mecânico e também de instrumentos endodônticos (EVANS et al., 2002).

4.5 Fatores de Dificuldade e Possíveis Soluções

O interessante da realização de projetos prévios aos estudos definitivos de pesquisa é podermos visualizar onde melhorias podem ser aplicadas.

Alguns fatores correlacionados ao desenvolvimento desta pesquisa e suas etapas necessitam de melhorias e intervenções para melhor desempenho e andamento de pesquisas futuras. Os fatores de dificuldade e possíveis soluções são mencionados abaixo, e estes podem ter levado a alterações nos resultados encontrados, sugerindo melhorias futuras.

4.5.1 Cianocrilato para Adesão das Amostras às tampas dos Microtubos

Este estudo nos permitiu inferir que o cianoacrilato utilizado durante o experimento na colagem das amostras às tampas do microtubo, podem ser difíceis de serem utilizados devido à sua textura lisa e sua baixa porosidade (SuperBonder cola plástica - Loctite, São Paulo, Brasil) quando em autoclave.

Notamos que após a esterilização em autoclave vertical a 120°C por um tempo de 15 minutos, o material (cianoacrilato) adquiriu características de derretimento, em alguns casos obliterando a entrada dos orifícios destinados a troca dos meios. Alguns orifícios no momento desta troca necessitaram ser “furados” novamente.

Os orifícios laterais destinados a troca de meio nas amostras, muitas vezes mostram-se obstruídos, isso pode ter ocorrido devido ao contato das altas temperaturas de esterilização das amostras com os microtubos na presença do cianoacrilato, escoando para a região correspondente ao orifício lateral. A cada novas trocas de meio muitas vezes era necessário executar um novo orifício com uma agulha de irrigação mais calibrosa, ou ampliar o mesmo orifício obstruído.

Optamos em estudos futuros não fazer uso deste material, e apenas encaixar os dentes das amostras no orifício destinado a elas nos microtubos.

4.5.2 Trocas de Meio de Cultura

Quando as trocas dos meios eram realizadas em algumas das amostras, apenas uma quantidade correspondente a aproximadamente $2/3$ do líquido presente no interior dos microtubos era possível de ser removida, o restante ficava em contato com a porção final dos microtubos, próximos ou em contato com as raízes das amostras. Sua totalidade era inviável de ser removida. Atribuímos este fator ao comprimento das agulhas utilizadas para remoção de meio de cultura, porém não encontramos disponível no mercado agulhas com comprimento maior ao utilizado. Uma solução possível para este impasse seria a substituição dos microtubos de 1,5 ml por outro recipiente que atenda nossas necessidades, ou buscar agulhas com comprimento maior que o utilizado. Este fator também não exerceu influência no resultado final dos achados deste trabalho, apenas tornaria o processo de desenvolvimento mais sistemático.

4.5.3 Sistemática de Inoculação dos Bacteriófagos

Em relação a inserção dos bacteriófagos nos microtubos, estes serão inseridos no orifício central em contato direto com o canal radicular, e não pelo orifício lateral como preconizamos no estudo piloto. E outro novo orifício lateral será realizado, para evitar que este possa obliterar por alguma razão específica e também para não haver refluxo dos meios ao serem inseridos. O método de inoculação dos fagos utilizado neste estudo foi através da imersão das amostras em solução contendo os bacteriófagos através da inserção pelo orifício lateral. Os resultados obtidos podem ter sofrido esta interferência.

4.5.4 Tempo de Armazenamento das Amostras em Glutaraldeído

Para o preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV), o período de armazenamento em contato com o glutaraldeído a 2,5% deveria ser superior a 24 horas, como foi realizado. Esse fator pode ter sido o mais significativo para as alterações que encontramos durante o desenvolvimento do projeto piloto. Incluir em estudos futuros imagens das amostras para bacteriófagos em FIB SEM, (microscopia eletrônica de varredura de feixe de íons focalizados), permitindo reconstrução 3D dos dentes infectados com *E. faecalis* e da ação dos bacteriófagos, permitindo melhor análise e visualização das amostras, e aprofundamento dos estudos. Incluir também análises através de Microscopia Confocal, afim de obter imagens de alta resolução através de cortes ópticos, reconstituídos tridimensionalmente.

Em relação as amostras analisadas pertencentes ao grupo de tratamento com fagos, pudemos inferir que talvez o fator tempo de 48 horas, pôde ter exercido também influência nos resultados, necessitando de análises futuras que correlacionem este fator para mais ou para menos para que assim possamos inferir com maior certeza se este exerce influência quando em contato com as cepas bacterianas estudadas ou não.

4.5.5 Período de Tempo de Permanência dos Fagos agindo nos Canais Radiculares

As amostras do Grupo 3 (Teste) que receberam tratamento com fagos, mantiveram contato com a solução de fagos por um período de 48 horas, o que talvez pode ser considerado como um período não ideal para resultados expressivos. Em próximo estudo iremos estabelecer diferentes tempos para administração de solução de fagos, para verificar se estes são tempos dependente de resultados mais efetivos.

4.5.6 Microtubos Utilizados

O tamanho dos microtubos com capacidade de 1,5ml e uma tampa trava quase correspondente ao diâmetro dos dentes, geraram dificuldades em relação a confecção do orifício principal correspondente ao local de posicionamento dos dentes, principalmente quando estes apresentavam raízes mais volumosas, e conseqüentemente deixando menos espaço para a confecção e manutenção do orifício lateral pelo qual as trocas dos meios eram realizadas, mesmo com o uso de agulhas com fino calibre. Este fator não exerceu influência no resultado final dos achados deste trabalho.

Outro ponto importante que notamos, foi a dificuldade em remover as raízes que estavam fixas nas tampas dos microtubos, para que posteriormente pudessem ser hemisseccionadas. Para a realização de próximo estudo iremos cortar previamente a alça que liga a tampa do microtubo ao corpo do mesmo. Deixando apenas o sistema de encaixe entre tampa e corpo, reforçando o vedamento destes com micropore, objetivando manter as amostras bem vedadas e longe de contaminações.

4.5.7 Dentes Humanos *versus* Dentes Bovinos e Protocolo de Desinfecção do Sistema de Canais Radiculares

Em virtude da dificuldade de encontrar dentes humanos extraídos nos dias de hoje, em número que se faça suficiente para a realização do experimento e nas condições desejadas, dentes bovinos são considerados uma opção. Estes apresentam vantagens quanto a sua fácil disponibilidade e seu tamanho (Campos et al., 2008) e a sua similaridade estrutural com dentes humanos, incluindo o sistema de túbulos dentinários, fator importante em nosso estudo.

Portanto, substituiremos os dentes humanos utilizados no estudo por dentes bovinos, e aumentaremos o número das amostras dos grupos de trabalho, e dos controles positivo e negativo.

Para a desinfecção dos canais, será utilizado um protocolo adaptado de Grundling et al (2011) com insertos ultrassônicos e soluções irrigadoras, como hipoclorito de sódio a 2,5%, EDTA trissódico a 17% e água destilada.

5. DISCUSSÃO

As infecções endodônticas e a periodontite perirradicular tem como uma de suas principais causas as bactérias patogênicas. As espécies bacterianas vão depender dos níveis de oxigênio, do pH local e da nutrição disponível no sistema do canal radicular (PECIULIENE et al, 2008).

Para que a infecção endodôntica ocorra, o tecido pulpar não vai encontrar-se vital e estará desprovido de suas defesas, como consequência de necrose pulpar (como trauma, seqüela de cárie, procedimentos cirúrgicos iatrogênicos ou doença periodontal) ou remoção da polpa para tratamento (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2009).

Erradicar a infecção presente ou evitar que microrganismos infectem ou reinfectem o canal radicular ou até mesmo os tecidos perirradiculares é a justificativa para

o tratamento endodôntico da periodontite apical, por ser considerada uma doença infecciosa (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2009).

É importante compreendermos e definirmos a microbiota endodôntica que estão associadas às diferentes formas de doença, para que se tenha uma prática endodôntica de alta qualidade e baseada em evidências (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2009).

A periodontite apical resulta dos efeitos patogênicos dos microrganismos que colonizam o sistema de canal radicular e da resposta do sistema de defesa do hospedeiro. A identificação precisa destes microrganismos nos permite entender o processo da doença fornecendo um tratamento antimicrobiano eficiente nos casos de tratamento endodôntico primário e retratamento, ou tratamento endodôntico secundário (PECIULIENE et al, 2008).

A composição da microflora dos canais radiculares difere principalmente em relação as mudanças ecológicas que ocorrem no canal radicular anteriormente e durante os procedimentos de tratamento (PECIULIENE et al, 2008).

O *E. faecalis* apresenta uma resistência intrínseca a muitos antibióticos habitualmente usados, e ele apresenta capacidade de obter resistência aos antibióticos disponíveis nos dias de hoje, através de mutação de transferência horizontal de genes (SOOD et al., 2008).

Citado por Plutzer e colaboradores (2018) em seu artigo, o único agente capaz de eliminar o biofilme de *E. faecalis* foi o hipoclorito de sódio a 4%. A exposição ao hipoclorito de sódio a 4% produziu uma queda de 95% na viabilidade bacteriana em 1 minuto, e isso aumentou para 99,99% em 10 minutos de exposição, sendo tempo dependente este resultado. Nenhuma bactéria viável foi notada após 30 minutos, 60 minutos ou 6 horas.

Em um estudo realizado por Souza e colaboradores (2018) com 132 dentes, divididos em 11 grupos, onde nenhum dos protocolos de descontaminação (água destilada, hipoclorito de sódio a 1% e 5%, PDT associado a água destilada e a hipoclorito de sódio a 1% e 2,5%, e hipoclorito de cálcio a 1% e 2,5% associados com PDT) abordados foram capazes de promover a remoção completa de *E. faecalis* dos canais radiculares. Porém, quando o PDT foi aplicado em conjunto nos grupos um maior nível de descontaminação foi observada.

Podemos interpretar que o fator tempo da utilização de solução de hipoclorito de sódio fez a diferença no estudo de Plutzer e colaboradores (2018) levando a erradicação

do *E. faecalis* quase ou na sua totalidade. Já no estudo de Souza e colaboradores (2018), mesmo frente as técnicas utilizadas o *E. faecalis* mostrou-se mais resistente as estratégias antimicrobianas, não sendo erradicado na sua totalidade, apesar de uma descontaminação ocorrida ter sido relatada.

Basmaci e colaboradores (2013) realizaram um estudo com 81 dentes pré-molares inferiores humanos extraídos com canal único, infectados com *E. faecalis* antes e depois do preparo do canal, associados a três sistemas de instrumentação e divididos em 9 grupos. Os resultados do estudo demonstraram que todos os sistemas de irrigação utilizados se mostraram eficazes contra *E. faecalis*. Porém, 15% EDTA ou 7% MA usado em combinação com NaOCl revelou melhores resultados em relação a ação contra o biofilme.

Ainda em relação a capacidade de erradicação de *E. faecalis*, sessenta canais radiculares foram inoculados com *E. faecalis* por 14 dias, divididos em seis grupos de acordo com o protocolo de descontaminação: sem tratamento, água destilada, hipoclorito de sódio 2,5%, e 5,25%, hipoclorito de cálcio 2,5% e 5,25%. O hipoclorito de sódio e cálcio, em associação com instrumentação reciprocante, pode ser um protocolo de descontaminação eficaz em canais radiculares infectados com *E. faecalis* (DAL BELLO et al., 2018).

Desta forma, a erradicação total do *E. faecalis* do interior dos canais radiculares, bem como dos túbulos dentinários, ainda é uma dificuldade que nos deparamos durante o tratamento endodôntico. Isso porque o *E. faecalis* é uma das espécies mais resistentes encontradas na cavidade oral, que possui capacidade de sobrevivência mesmo sob estresses ambientais incomuns, como baixa disponibilidade de nutrientes (SIQUEIRA et al., 2002) sendo este um microrganismo altamente resistente as estratégias antimicrobianas.

Em estudo realizado por Gao e colaboradores (2016) *E. faecalis* mostrou mais resistência à falta de nutrientes na presença de *C. albicans*, *S. gordonii*, *A. viscosus* e *L. acidophilus*, respectivamente, do que quando isoladamente. A morte e decomposição de *C. albicans*, *S. gordonii*, *A. viscosus* ou *L. acidophilus* podem ser fontes de nutrição para que o *E. faecalis* sobreviva (GAO et al., 2016). Como conclusão, as comunidades de multiespécies são propícias à resistência aos nutrientes dos *E. faecalis* e formação de biofilme em canais radiculares.

Em estudo comandado por Rôças e colaboradores (2004) mostrou que o *E. faecalis* esteve muito mais associado a casos assintomáticos do que casos sintomáticos. Dos 30 casos abordados de infecções endodônticas persistentes associadas a dentes obturados o *E. faecalis* foi detectado em 20 casos.

Rôças e colaboradores (2004) determinaram que o *E. faecalis* não é tão prevalente em infecções primárias como é em infecções persistentes, através de resultados obtidos pela técnica de PCR nested (RÔÇAS et al., 2004). Neste mesmo estudo o *E. faecalis* foi detectado com mais frequência em casos assintomáticos do que sintomáticos, perfazendo um total de 11,5% dos dentes assintomáticos, e 3,7% dos casos sintomáticos. Também no mesmo estudo o *E. faecalis* foi fortemente associado a falhas no tratamento endodôntico, sendo detectado em 18% dos casos de infecções endodônticas primárias e em 67% em dentes obturados (RÔÇAS et al., 2004).

Grundling et al. (2011), em seu estudo utilizou como amostra oitenta e quatro incisivos bovinos inoculados com *E. faecalis* divididos em quatro grupos. De acordo com os resultados no estudo em questão e que reforça as discussões anteriores, houve diferenças relevantes entre o grupo controle e o grupo ultrassônico + água destilada e entre esses grupos e os grupos em uso de hipoclorito de sódio. E ainda conforme cita o estudo, tais resultados são coerentes com os achados de Siqueira e colaboradores (1997) e Bhuvra e colaboradores (2010), que também não encontraram diferença entre a irrigação convencional com NaOCl e a irrigação ultrassônica passiva associada ao NaOCl (Grundling et al., 2011).

Sabe-se que uma das medicações mais eficientes frente as bactérias, disponíveis durante o tratamento endodôntico é o hidróxido de cálcio, e isto se deve a sua alta alcalinidade (SJOGREN et al., 1991; SHUPING et al., 2000). Por este motivo o *E. faecalis* pode resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio, pois suportam altos níveis de pH (pH>11,5) (BYSTROM et al., 1985). Bystrom e colaboradores (1985) ainda reforçam que para que se tenha um efeito bactericida sobre o *E. faecalis* o pH precisa atingir níveis de 11,5 ou mais.

Segundo Siqueira JF & Rôças (2009) em uma ampla revisão de literatura da microbiologia endodôntica, levando ao desfecho de que a periodontite apical tem etiologia polimicrobiana. Os variados tipos de infecções endodônticas são normalmente representados por uma associação mista, na qual a diversidade varia conforme o tipo de infecção.

A coleta das amostras do canal radicular pode ser realizada no momento do tratamento, com objetivo de verificar as condições bacteriológicas do canal antes dos procedimentos de preenchimento do canal radicular e/ou de avaliar a eficácia antimicrobiana dos protocolos de tratamento. Uma média de 1 a 5 espécies bacterianas, em contagens que chegam de 10² a 10⁵ células por canal, podem ser abrigadas, isto após a preparação químico-mecânica, podendo ser seguida por medicação intracanal (BYSTRÖM, SUNDQVIST, 1985; SJÖGREN et al., 1997). Isso indica que, mesmo que a eliminação bacteriana total não ocorra, vai ocorrer pelo menos uma redução na diversidade de espécies após o tratamento (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2009).

Na maioria dos estudos as bactérias Gram-positivas estão mais frequentemente presentes quando as bactérias resistem aos procedimentos de tratamento. Incluem estreptococos (*S. mitis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. sanguinis* e *S. oralis*), *P. micra*, espécies de *Actinomyces* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), espécies de *Propionibacterium* (*P. acnes* e *P. propionicum*), *P. alactolyticus*, *Lactobacilli* (*L. paracasei* e *L. acidophilus*), *E. faecalis* e *O. uli*. Também podem ser encontradas outras bactérias Gram-positivas, incluindo espécies *Bifidobacterium*, espécies *Eubacterium* e estafilococos, porém em menor frequência (SJÖGREN et al., 1997; CHU et al., 2006).

Zhang et al (2013b) objetivando o uso dos fagos para tratamento de infecções com o *E. faecalis* procurou desenvolver por meio da engenharia genética um bacteriófago que fosse eficiente no controle antimicrobiano e que desempenhasse o ciclo lítico.

Conforme Khalifa (2016), os bacteriófagos são capazes de trabalhar na prevenção de reinfecções endodônticas, mesmo que em estado latente uma vez administrada no canal.

Khalifa et al (2015) isolaram *E. faecalis* (EFDG1) a partir do esgoto, e como resultado sugerido de seu estudo, a terapia fágica com EFDG1 pode ser eficiente para prevenir infecções por *E. faecalis* após o tratamento endodôntico. Neste estudo de Khalifa e colaboradores (2015) os resultados mostram que EFDG1 é um candidato promissor para terapia fágica contra biofilmes planctônicos e bem estabelecidos de *E. faecalis*.

Em 2016, Khalifa e colaboradores reforçaram o potencial envolvido na terapia fágica dentro da odontologia, principalmente no combate à biofilmes de *E. faecalis* no interior dos canais radiculares, no entanto, este tipo de terapia tem sido pouco explorada, ainda que seja conhecido há mais de 80 anos, sua eficácia em infectar cepas de *E. faecalis* (CLARK et al., 1927; EVANS, 1934).

Quando surge uma variante de um patógeno específico que apresenta-se insensível a tal fago, pode-se facilmente adaptar o (s) fago (s) disponíveis para estas novas cepas. Uma outra opção a adaptação fágica é procurar fagos que se liguem a determinantes de virulência de superfície, onde eles são conhecidos. Estes são geralmente compartilhados por muitas ou todas as cepas relevantes, e assim as bactérias resistentes aos fagos poderão ser atenuadas. Como terceira opção, seria possível produzir uma quantidade variável de fagos que podem ser usadas combinadas contra as principais cepas de bactérias (BARROW, 1997).

Desta forma, o tratamento não ficaria limitado as opções antibacterianas disponíveis, nem como em casos de infecções persistentes em que o tratamento endodôntico convencional não é suficiente. Assim, novas adaptações fágicas podem ser exploradas, em termos de quantidade, não apresentando maiores riscos devido a especificidade fágica podendo ser utilizadas de forma combinada com as principais cepas bacterianas.

Barrow (2001) em seu estudo demonstrou um breve relato sobre a utilização de fagos líticos no combate as doenças infecciosas, levando em conta o seu uso em animais e em humanos. Com base em seus achados o autor concluiu que a utilização da terapia fágica mostrou uma resolução profilática e terapêutica melhor do que quando comparada a antibioticoterapia. Ressaltou que enquanto a efetividade e disponibilidade de antibióticos ainda existirem a terapia fágica não seria o tratamento de escolha. Porém, em infecções onde ainda nos deparamos com microrganismos resistentes como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* a fagoterapia deve ser levada em consideração.

Tinoco (2017) em sua tese, promoveu o isolamento de bacteriófagos para *E. faecalis*, através de duas cepas, JH2-2 (resistente ao ácido fusídico e resistente a rifampicina, sensível à vancomicina) e V583 (resistente à vancomicina) que receberam marcadores de resistência a antibióticos previamente. No primeiro experimento obtiveram como resultado redução da carga bacteriana dos biofilmes. De acordo com a própria autora, este estudo sugeriu que os fagos conseguiram penetrar no biofilme nas lamínulas de vidro matando bactérias de ambas as cepas de *E. faecalis*.

Em segundo estudo e experimento realizado por Tinoco (2017), em *ex vivo* com dentina contaminada, notou-se diminuição da carga bacteriana por meio do tratamento utilizando-se fagos, quando comparados com o grupo controle, que receberam apenas

BHI. Conforme informado pela própria autora, este estudo conduzido por ela foi o primeiro a avaliar a eficácia de um bacteriófago que sofreu modificação genética que tinha como objetivo desinfetar a dentina contaminada com o uso de uma cepa de *E. faecalis* resistente a antibióticos, levando a interessantes perspectivas futuras de estudo.

Bhardwaj (2014) em sua revisão de literatura informou que a identificação e o isolamento de fagos líticos para patógenos orais podem ser úteis como abordagens terapêuticas em Odontologia. Principalmente quando notamos que não erradicou-se totalmente os *E. faecalis* do interior do canal radicular das hemisseções avaliadas neste estudo.

Um ensaio de Fase I / II randomizado, duplo-cego, em pacientes com otite crônica causada por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos, foi realizado por Wright e colaboradores em 2009. Os pacientes participantes do estudo foram tratados com dose única de coquetel de fago (compreendendo seis fagos de *P. aeruginosa* diferentes) ou placebo. Como desfecho não se observou nenhum evento adverso que estivesse relacionado ao tratamento, e as medidas de conclusão clínica foram favoráveis (WRIGHT et al., 2009).

Em outro estudo dirigido por Gelman e colaboradores (2018) realizado em um modelo de camundongos, na qual dois bacteriófagos líticos foram usados com objetivo de avaliar o efeito da terapêutica com fagos, face a peritonite séptica grave, causada por *E. faecalis* resistente à vancomicina. No ensaio, após o tratamento com o coquetel de bacteriófago ou com a terapia dupla (bacteriófago e antibiótico), as bactérias se mantiveram suscetíveis aos bacteriófagos e também aos antibióticos.

Quando inúmeras cepas bacterianas podem se apresentar associadas em doenças, o emprego de coquetéis de fago é considerado apropriado em relação a preparações de fago único, em intervenções terapêuticas (KHALIFA et al., 2018). Justificando também o uso de coquetéis, Gelman e colaboradores (2018) reforçam que seu uso aumenta a eficiência antibacteriana controlando a aceleração de mutações de resistência a bacteriófagos, além da associação de bacteriófagos com um regime antibiótico que proporciona um efeito benéfico adicional no sucesso do tratamento.

Os fagos líticos, de um modo geral são mais indicados para serem usados nas terapias quando comparados com os fagos temperados (lisogênicos). Os fagos temperados podem aumentar a virulência bacteriana espalhando seus genes, e demonstram um potencial de morte menor (KROPINSKI, 2006; FARD et al, 2011; LOC

- CARRILLO et al., 2011). Portanto, determinar a caracterização dos genomas de fago antes de serem inclusos na terapêutica é muito importante (HANLON, 2012).

Reforçando a teoria da especificidade acima citada, Hanlon (2007) afirma que os bacteriófagos apresentam especificidade em seu espectro de atividade. Logo, apresentam-se promissores face a patogenia de microrganismos infecciosos.

Um ensaio envolvendo bacteriófagos líticos contra *Staphylococcus aureus* multirresistente, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* isolados de infecções associadas a implantes ortopédicos que apontam padrões de multirresistência aos antibióticos usados com mais frequência em ambientes clínicos, foi desenvolvido por Barros e colaboradores (2019). Neste estudo, foi avaliada a capacidade dos bacteriófagos vB_SauM_LM12, vB_EfaS_LM99 e vB_EcoM_JB75 de infectar isolados clínicos de *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*, respectivamente (Barros et al., 2019). O resultado deste ensaio demonstrou que os bacteriófagos apresentaram grande eficácia e especificidade para infectar e diminuir o número de bactérias clínicas, inclusive o *S. aureus*, que apresenta resistência à metilina e enterococos resistentes à vancomicina.

Realçando e reforçando o ensaio anterior, sabemos que o *E. faecalis* apresenta resistência a muitos antibióticos, como penicilina, ampicilina, piperacilina, imipenem e vancomicina – os quais apresentam somente efeitos bacteriostáticos e não bactericidas (Kristich et al., 2014). O *E. faecalis* e outros enterococos resistentes também à vancomicina (VRE) vem gerando muita preocupação (BOLOCAN et al., 2019) nos dias de hoje.

Outro exemplo no qual podemos embasar a utilização da terapia fágica e pensar no seu uso como opção aos antibióticos, foi relatado por Letkiewicz e colaboradores (2009), onde três pacientes se encontravam sob tratamento para prostatite bacteriana crônica. Até então as terapias às quais os pacientes haviam sido submetidos não tinham apresentado sucesso. Através de um protocolo de terapia fágica experimental administrado na Unidade de Terapia Fágica em Wroclaw, foi realizada a aplicação retal de 10 mL de lisado de fago, duas vezes ao dia, por 30 dias contra *E. faecalis* cultivado a partir do fluido prostático. Em todos os pacientes houve a erradicação do patógeno, além da redução dos sintomas e não foi constatada a recorrência precoce da doença.

Para o uso eficaz da terapia fágica é necessário ter um diagnóstico preciso do patógeno infectante, e ter certeza de que este patógeno é suscetível ao bacteriófago que

está sendo usado. Porém, isso não quer dizer que a resistência não surja no uso de bacteriófagos (HANLON, 2012).

Grande parte das células podem se apresentar sensíveis a um bacteriófago específico, ainda assim algumas células mutantes terão características alteradas e podem não responder ao fago utilizado. Este é um argumento a favor do uso de coquetéis de fago, defendido por Hanlon (2012) e reforçado por Theuretzbacher (2012) por considerar que estes tem potencial mais amplo de desempenhar um papel importante na minimização da resistência.

Uma das amostras analisadas em MEV do Grupo 3 (Teste), mostrou-se com uma grande quantidade de bactérias, justificando a importância de novos estudos sobre bacteriófagos e sua ação dentro da Endodontia.

Em estudo realizado por Haapasalo & Orstavik (1987) com microscopia eletrônica de varredura e de luz registrou a presença de bactérias nos túbulos dentinários de todos os blocos inspecionados no grupo controle utilizados no seu estudo, ainda assim, notou-se que uma pequena porcentagem de túbulos dentinários apresentava-se infectada.

Em 1994, em estudo mais recente, SafaviKE et al (1994) relataram que a inativação de microrganismos e a cicatrização dos tecidos ocorresse é necessário que a eficiência do hidróxido de cálcio esteja relacionada de forma direta à dissociação em íons cálcio e hidroxila, isso porque, os íons de hidroxila irão inativar o lipopolissacarídeo bacteriano negativo (LPS) e se difundir nos túbulos dentinários.

Assim, como notamos na amostra correspondente ao Controle Positivo, a presença de *E. faecalis* foi vista em sua extensão total, inclusive na região de túbulos dentinários. Áreas que ainda não conseguimos eliminar de forma segura o biofilme bacteriano presente.

Para que ocorra a inativação de microrganismos e a cicatrização dos tecidos é necessário que a eficiência do hidróxido de cálcio esteja relacionada de forma direta à dissociação em íons cálcio e hidroxila (Sáez et al., 2017). Os íons de hidroxila irão inativar o lipopolissacarídeo bacteriano negativo (LPS) e se difundir nos túbulos dentinários (SafaviKE et al, 1994; Zmener, 2007) ou no forame apical para alcançar os tecidos circundantes, canais secundários e acessórios (Zmener, 2007), sendo a região do forame apical o local mais eficaz (HOSOYA et al., 2001).

A inativação promovida pelo hidróxido de cálcio permite que ele alcance regiões contaminadas por microrganismos, áreas que apresentam reabsorção radicular e até

mesmo em tecidos circunvizinhos, proporcionando sua ação antimicrobiana e antirreabsortiva (ZMENER, 2007).

Pereira e colaboradores (2018) desenvolveram um estudo sobre a capacidade de descontaminação intratubular e propriedades físico-químicas de pastas de hidróxido de cálcio e posterior avaliação em microscopia confocal de varredura a laser. Todas as amostras diminuíram a contaminação intra-dentinária, especialmente a pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina e paramonoclorofenol canforado, apresentando como conclusão do estudo que os veículos e aditivos testados podem aumentar o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio.

Conforme cita Paisano (2008), eliminar as bactérias que se apresentam no interior do túbulos dentinários é uma preocupação atual especialmente nos casos em que não obtemos sucesso com o tratamento endodôntico.

Como uma possível solução futura, os bacteriófagos apresentaram ação sobre as bactérias de *E. faecalis* não somente na extensão do canal principal, mas também sobre as bactérias no interior dos túbulos dentinários. Por serem regiões que não conseguimos chegar com instrumentos endodônticos para realizar o desbridamento, e a ação dos irrigantes utilizados durante o preparo do canal radicular também fica limitada, tornando esta opção bastante promissora.

A bioluminescência analisada neste estudo, ocorre através de uma reação química, em que a luz visível é gerada por um organismo vivo. Para que ocorra a produção de luz todas as bactérias luminosas conhecidas utilizam a mesma reação enzimática, que é baseada na luciferase bacteriana (ROBERTSON et al., 2011).

Ao contrário da bioluminescência, a fluorescência é quando substâncias irão emitir luz. A luz é emitida em um comprimento de onda mais longo, e absorvida em um comprimento de onda mais curto (JIA, IONESCU, 2015).

Compostos porfirínicos irão dar origem a fluorescência vermelha. Alguns microrganismos que se encontram nos biofilmes tem a capacidade de sintetizar os compostos porfirínicos (LEE et al., 2018). O *E. faecalis* não se encontra neste grupo de microrganismos, porque não conseguem sintetizar as porfirinas, conseqüentemente não irão gerar fluorescência sendo necessário o uso de fluoróforos para que possam ser detectados e visualizados (FRANKENBERG et al., 2002).

Quando da presença de *E. faecalis* no grupo Controle Positivo o fluoróforo Qubit emitiu bioluminescência em toda a extensão do canal radicular hemisseccionado. Desta

forma, proteínas fluorescentes vem se tornando mais presentes nas pesquisas, por apresentarem alta sensibilidade (NOGALES et al., 2014). O fenômeno de autofluorescência é causado por metabólitos bacterianos. A concentração de porfirinas em bactérias orais Gram-negativas é alta, indicando que a luz vermelha quando observada é produzida por biofilmes maduros e patogênicos. Conforme a maturação do biofilme e sua patogenicidade a luz vermelha se intensifica também (COULTHWAITTE et al., 2007).

Frente a utilização de bacteriófagos em uma das hemisseções a concentração bioluminescente diminuiu proporcionalmente a concentração de bactérias ainda presentes nesta hemisseção. O Qubit Protein, apresentou-se capaz de delimitar precisamente a região correspondente a área contaminada por *E. faecalis*.

De forma geral, os achados deste estudo são relevantes, por fornecer informações pertinentes ao tratamento do biofilme endodôntico, os quais podem comprometer o sucesso do tratamento, seja quando presente, quando não removidos de forma adequada, frente a infecções persistentes, primárias ou secundárias, e principalmente quando temos *E. faecalis* presente neste contexto.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS DO ESTUDO

Este estudo nos mostra que estamos no caminho correto para dar continuidade a esta pesquisa, utilizando um número de amostras maiores e associando o fator tempo ao caldo de fagos em contato com os dentes das amostras, buscando verificar se este em maior contato com os *E. faecalis* interfere positivamente levando a uma maior lise bacteriana ou à sua total erradicação.

Poderíamos pensar como soluções futuras, a utilização de bacteriófagos associados a algum veículo como por exemplo o próprio hidróxido de cálcio, que tem por objetivo estabelecer um pH alcalino no interior do canal radicular (aproximadamente pH 12.5), onde grande parte dos microrganismos não conseguem sobreviver. A sua penetrabilidade nos túbulos dentinários é baixa, favorecendo a permanência de bactérias (Gomes BP et al., 2006), entretanto, com a presença de bacteriófagos esta característica poderia ser melhor desempenhada, e através de estudos futuros mostrar-se com uma penetrabilidade dentinária positiva.

Mesmo apresentando grande valor como medicação intracanal na endodontia, o hidróxido de cálcio também apresenta algumas limitações em relação ao seu espectro

antibacteriano, apresentando efeito limitado sobre alguns microrganismos da microflora endodôntica, como é o caso do *E. Faecalis* (Siqueira & Lopes, 1999).

Unir os pontos positivos de cada terapia, tanto da medicação intracanal (hidróxido de cálcio) quanto da terapia com fagos, buscando erradicar da melhor maneira as bactérias presentes no canal radicular e nos túbulos dentinários, principalmente sobre o *E. faecalis*.

Este estudo abre caminho para que possamos pensar inicialmente em desenvolver pesquisas que correlacionem o uso da pasta de hidróxido de cálcio em associação com os bacteriófagos, ponto central desta dissertação, verificando se assim possa haver um aumento das propriedades destas ferramentas frente a resistência do *E. faecalis*.

Em uma revisão sistemática, publicada no ano de 2014 a respeito do uso de Clorexidina associado com hidróxido de cálcio, mostrou que a mistura de ambas não melhora a propriedade antibacteriana do hidróxido de cálcio como medicamento contra o *E. faecalis* (SAATCHI et al, 2014).

Da mesma forma, mais estudos que envolvam medicações intracanaís, como o hidróxido de cálcio, com ou sem associações necessitam ser realizados, ou até mesmo buscar alternativas substitutivas ou complementares a estas medicações intracanal, como é o caso dos bacteriófagos, para atuar frente a resistência do *E. faecalis* em relação a pasta antimicrobiana de hidróxido de cálcio e frente a sua permanência em canais infectados.

Também pensar em soluções de irrigação que apresentem em sua composição composto de bacteriófagos específicos ou combinados para determinadas cepas bacterianas, tanto as que apresentam maior resistência durante o tratamento quanto as que apresentam maior virulência. Da mesma forma, propagar a ideia de utilização de irrigação com composição de fagos específicos ou compostos, para realização de protocolos de irrigação ultrassônica passiva (PUI), com o objetivo de realizar uma melhor sanificação do sistema de canais radiculares.

A eficácia de limpeza do PUI implica na remoção efetiva de restos de dentina, microrganismos (planctônicos ou em biofilme) e tecido orgânico do canal radicular. Quando foi introduzido pela primeira vez, o termo ‘Passivo’ relacionou-se a ação não cortante do mesmo (VAN DER SLUIS et al., 2007).

A terapia fágica nos permite explorar múltiplas áreas e a buscar associações de técnicas como a microscopia de luz (fluorescência), que vem se tornando um procedimento para contagem de partículas de vírus, principalmente em bacteriófagos

(WEINBAUER, 2004; WINTER et al., 2004; WILLIAMSON et al., 2005; FILIPPINI et al., 2006).

Através do crescente aumento de informações disponíveis e acessíveis sobre as aplicações terapêuticas mais antigas em todo o mundo em relação aos fagos; das aprovações para uso em relação a segurança alimentar; os primeiros testes modernos de eficácia em humanos ocidentais; a terapia fágica parece estar sendo bem encaminhada (LU et al., 2011) abrindo portas para que novas possibilidades sejam exploradas ao uso dos fagos na Odontologia e principalmente na Endodontia.

Uma solução futura possível que deve ser mais estudada e vem sendo abordada ao decorrer do texto, diz respeito a coquetéis de fagos. Estes podem compreender uma série de bacteriófagos diferentes que seriam empregados para ampliar o estudo da terapia fágica, inclusive associados a outros grupos de bactérias que infectam o sistema de canais radiculares.

Estudos em relação a novos fármacos e/ou protocolos combinados ou associados devem ainda ser impulsionados objetivando o incentivo a novas formas de atuação frente a microrganismos patogênicos presentes nas patologias endodônticas, devido à pluralidade das culturas microbianas.

A utilização de fagos dentro da odontologia, principalmente na Endodontia através da irrigação e medicação dos canais parece propício (Lazavera et al., 2001). Conforme Lazavera et al. (2001), colutórios a base de suspensões de fagos poderiam ser utilizados durante procedimentos cirúrgicos prevenindo infecções.

Células com defeitos graves sofrem morte celular programada (PCD). Em outras palavras, os antibióticos não matam as células, mas causam danos que desencadeiam o seu suicídio (LEWIS, 2001). Através desta afirmação de Lewis (2001), poderíamos pensar em mecanismos que fizessem com que os fagos levassem as células do biofilme a desenvolver defeitos nelas mesmas, acelerando e levando a sua própria morte.

Apesar das limitações dos bacteriófagos, temos informações suficientes e publicadas para comprovar que a terapia com fagos tem um grande potencial de benefício terapêutico (HANLON, 2012).

Para que seja possível desenvolver técnicas que possam ser utilizadas frente a bactérias capazes de se tornarem resistentes à medicamentos, refratárias à ação dos antibióticos. A eficácia *in vitro* necessita ser testada para que futuramente possamos

idealizar o mesmo modelo *in vivo*, a fim de ganhar confiança para o desenvolvimento clínico.

No entanto, temos que ainda ter em mente que desenvolver bacteriófagos não é uma tarefa fácil, especialmente desenvolver um bacteriófago altamente purificado, geneticamente definido, virulento, de amplo espectro e não transdutor, e que seja apropriado para uso terapêutico (HANLON, 2012).

Vencer as barreiras a respeito dos bacteriófagos para que sejam cada vez mais e estudados como agentes terapêuticos, se faz necessário (LU et al., 2011). Segundo Lu et al. (2011) espera-se que haja uma injeção de mais financiamento para seu desenvolvimento, através de estudos laboratoriais e clínicos, para que seja possível sua utilização e comercialização segura, possibilitando abranger mais áreas da saúde, para que possam ser resolvidas ou amenizadas através da terapia fágica.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estratégias que possibilitem a desinfecção do sistema de canais radiculares através do tratamento endodôntico com auxílio de mecanismos terapêuticos ainda se faz necessário, principalmente quando associamos o fato de que algumas espécies bacterianas se correlacionam com o insucesso, principalmente o *E. faecalis*.

O aumento dos casos infecciosos relacionadas a cepas bacterianas resistentes à antibióticos e formação de biofilme, associados a medidas convencionais de utilização de antimicrobianos de forma desenfreada, demandam que se desenvolvam técnicas e estratégias alternativas.

Muitas questões ainda sobre fagos necessitam ser abordadas para que possamos produzir terapias eficientes e seguras além das condições laboratoriais (NAKONIECZNA et al., 2015).

É importante também que técnicas alternativas sejam estudadas e avaliadas de forma gradual frente a bactérias capazes de se tornarem resistentes à medicamentos, tornando-se estas opções futuras e eficientes para uso seguro em pacientes, como é o caso da terapia fágica, que está novamente ganhando espaço como uma opção viável de tratamento.

Se faz necessário atualmente ter mais cautela na administração e indicação da terapia antibiótica, devido a sua resistência adquirida ao longo dos anos, para que ainda

possamos ter opções alternativas em relação ao seu uso para combater infecções que venham a se apresentar.

Com este estudo pretendemos delinear uma alternativa de ação frente ao biofilme endodôntico, substitutiva e/ou complementar à ação de antimicrobianos, estudando e buscando entender melhor o funcionamento do biofilme endodôntico e dos fagos.

REFERÊNCIAS

- Aas, J.A. et al. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p. 5721–5732, 2005.
- Abbott, P.V.; Hume, W.R.; Pearman, J.W. Antibiotics and endodontics. **Australian Dental Journal**, v.35, n.1, 50–60, 1990.
- Abdullah, M. et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **J Endod.** v.31, p.30–36, 2005.
- Abedon, S.T. et al. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**. v.1, p.66–85, 2011.
- Abedon, S.T. Phages In: Hyman P., Abedon S., editors. Bacteriophages in Health and Disease. 1st ed. CAB International; Cambridge, MA, USA: 2012. pp. 1–5. **Advances in Molecular and Cellular Microbiology**.2012.
- Ackermann, H.W. Bacteriophage observations and evolution. **Res Microbiol.** v.154, p.245-251, 2003.
- Ackermann, H.W. Bacteriophage classification, in Bacteriophages: Biology and Applications (eds E. Kutter and A. Sulakvelidze). **CRC Press, Boca Raton, FL**. p.67–90, 2005.
- Ackermann H.W. Phage Classification and Characterization. **Bacteriophages**. p.127–140, 2009.
- Ackermann H.W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. **Adv.Virus Res.** v.51, p.135-201, 1999.
- Afkhami, F. et al. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dentistry**. v.43, n.12, p. 1573–1579, 2015.
- Alberts, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**, 2nd ed. New York: Garland Publishing. 1989.
- Alemayehu, D. et al. Bacteriophages MR299-2 and NH-4 Can Eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the Murine Lung and on Cystic Fibrosis Lung Airway Cells. **MBio**. v.3, n.2, 2012.
- Baldasso et al. Microflora associated with primary endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. **Microsc Res Tech.** v.75, p.1557-63, 2012.
- Barros J. et al. Lytic bacteriophages against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* strains isolated from orthopedic implant-associated infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2019.

Barrow, P.A.; Soothill, J.S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. **Trends in Microbiology**. v.5, n.7, p.268–271, 1997.

Basmaci, F.; Oztan, M.D.; Kiyani, M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. **Int Endod J**. v.46, n.9, p.823-30, 2013.

Baumgartner, J.C.; Falkler, W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J Endod**. v.17, p.380–3, 1991.

Bhardwaj, S.B. Int bacteriophage therapy: a possible new alternative for oral diseases. **J. Curr. Microbiol. App.Sci**. v.3, n.6, p.437-444, 2014.

Bhuva B. et al. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. **Int Endod J**. v.43, p.241–50, 2010.

Blome, B. et al. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol**. v.23, p.384-90, 2008.

Bolocan et al. Evaluation of Phage Therapy in the Context of *Enterococcus faecalis* and Its Associated Diseases. **Viruses**. v.11, n.4, p.366, 2019.

Bruttin, A.; Brussow, H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.49, p. 2874–2878, 2005.

Buckling, A; Brockhurst, M. Bacteria–virus coevolution. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.751, p.347–370, 2012.

Bukhary, S.; Balto, H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. **Journal of Endodontics**, v.43, n.4, p.643–64, 2017.

Burrowes, B. et al. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.9, n.9, p.775-85, 2011.

Bystrom, A.; Sundqvist, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scandinavian Journal of Dental Research**. v.89, p.321–8, 1981.

Bystrom, A. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endodontics & Dental Traumatology**, v.3, p.58–63, 1987.

Bystrom, A.; Sundqvist, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **International Endodontic Journal**. v.18, n.1, p.35–40, 1985.

Campos, M.I.C.; Campos, C.N.; Vtral, R.W.F. O Uso de Dentes Bovinos como Substitutos de Dentes Humanos em Pesquisas Odontológicas: Uma Revisão da Literatura. **Pesq Bras Odontoped Clin Int.** v.8, n.1, p.127-32, 2008.

Chu, F.C. et al. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. **J Endod.** v.32, p.17-23, 2006.

Clark, P.F.; Clark, A.S. A Bacteriophage Active Against a Virulent Hemolytic Streptococcus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v.24, n.7, p.635-639, 1927.

Clegg, M.S. et al. The Effect of Exposure to Irrigant Solutions on Apical Dentin Biofilms In Vitro. **Journal of Endodontics.** v.32, n.5, p.434-437, 2006.

Coelho, J. et al. Multiresistant Acinetobacter in the UK, pp. how big a threat? **Journal of Hospital Infection.** v.58, p.167-169, 2004.

Chopin, A. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. **Nucleic Acids Research,** v.29, n.3, p.644-651, 2001.

Cossart, P.; Helenius, A. Endocytosis of Viruses and Bacteria. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** v.6, n.8, p.a016972-a016972, 2014.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science.** v.284, p.1318-1322, 1999.

Coulthwaite, L.; Verran, J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. **British Journal of Biomedical Science,** v.64, n.4, p.180-189, 2007.

D'arcangelo, C.; Varvara G.; De Fazio, P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. **J. Endod.** v.25, p.351-353, 1999.

D'Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. **Les Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences.** v.165, p.373-375, 1917.

Dal Bello, Y. et al. Effectiveness of calcium and sodium hypochlorite in association with reciprocating instrumentation on decontamination of root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Australian Endodontic Journal.** v.45, n.1, p.92-97, 2018.

Dasilva, L. et al. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. **J Endod.** v.39, n.2, p.249-53, 2013.

De Castro, L.A.S. **Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura.** 1ª ed. Embrapa – Pelotas – RS. 2002.

- DiMasi, J.A. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**. v.22, p.151–185, 2003.
- Distel, J.W.; Hatton, J.F.; Gillespie, M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**. v.28,p.689–693, 2002.
- Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.2, p.167–193, 2002.
- Drulis-Kawa, Z. et al. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. **Curr.Protein Pept. Sci**. v.13, p.699–722, 2012.
- Duckworth, D.H. Who discovered bacteriophage? **Bacteriological Reviews**. v.40,p.793–802, 1976.
- Elbreki M. et al. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. **J Viruses**. v.20, 2014.
- Estrela C. et al. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* – a systematic review. **J. Appl. Oral Sci**. v.16, 2008.
- Estrela, C. et al. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J. Appl. Oral Sci**. v.17,p.87-91, 2009.
- Evans, A.C. The prevalence of streptococcus bacteriophage. **Science**. v.80, n.2063,p. 40–41, 1934.
- Evans, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus Faecalis* to Calcium Hydroxide. **Australian Endodontic Journal**. v.27, n.3, p.115–115, 2001.
- Evans, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J**. v.35, p.221–228, 2002.
- Fard, R.M.N.; Barton, M.D.; Heuzenroeder, M.W. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. **Lett Appl Microbiol**. v.52,p.559–564, 2011.
- Fenton, M. et al. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. **Bioeng bugs**. v.1, p.9–16, 2010.
- Figueiredo, J.A.P. et al. Dendritic cells and their relation to apical peridontitis. **Braz. Oral. Res**. v.32 supl.1, 2018.
- Filippini, M. et al. Infection paradox: high abundance but low impact of freshwater benthic viruses. **Appl. Environ. Microbiol**. v.72, p.4893–4898, 2006.
- Fischetti, V.A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**. v.300, n.6, p.357–362, 2010.

Frankenberg et al. *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. **Journal of Bacteriology**. v.184, n.22, p.6351-6356, 2002.

Gao, Y. et al. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Endodontics**. v.42n.8, p.1233-1238, 2016.

Gelman, D. et al. Combined bacteriophages and antibiotics as an efficient therapy against VRE *Enterococcus faecalis* in a mouse model. **Research in Microbiology**, 2018.

Gibbons, R.J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. **J. Dent. Res.** v.68, p.750-760, 1989.

Golais, F., Holly, J., Vítková, J. Coevolution of bacteria and their viruses. **Folia Microbiol.** v.58, p.177-186, 2013.

Gomes, B.P.; Lilly, J.D.; Drucker, D.B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int Endod J.** v.29, p.69-75, 1996.

Gomes, B.P. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.102, n.4, p.544-50, 2006.

Gonzalez, C.F., Domingo-Calap, P. Phages for Biofilm Removal. **Antibiotics**. v.9, p.268, 2020.

Gründling, G.L. Effect of Ultrasonics on *Enterococcus faecalis* Biofilm in a Bovine Tooth Model. **Journal of Endodontics**. v.37, p.1128-1133, 2011.

Haapasalo, M.; Ørstavik, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **Journal of Dental Research**. v.66, p.1375-9, 1987.

Haapasalo, M.; Ranta, H.; Ranta, K.T. Facultative Gram-Negative Enteric Rods in Persistent Periapical Infections. **Acta Odontologica Scandinavica**. v.41,n.1, p.19-22,1983.

Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol.** v.2,n.2, p.95-108, 2004.

Hancock, H.H. III et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** v.91, p.579-586, 2001.

Hanlon, G. W. Applications of Bacteriophage Technology. **Russell, Hugo & Ayliffe's**, p.565-575, 2012.

Hanlon, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.30, p.118-128, 2007.

Harmsen, H.J.M. et al. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. **Microbiology**. v.148, n.6, p.18663-70, 2015.

- Harper, D.R., Burrowes, B.H., Kutter, E.M. Bacteriophage: **Therapeutic Uses. eLS.** 2014.
- Herzog, D.B. et al. Bacterial Detection during Endodontic Treatment. **Journal of Dental Research.** v.96, n.6, p.626-632, 2017.
- Hoyle, B.D.; Jass, J.; Costerton, J.W. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. **J. Antimicrob. Chemother.** v.26, p.1-5, 1990.
- Jenkinson, H.F.; Lappin-Scott, H.M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology.** v.9, n.1, p.9-10, 2001.
- Jett, B.D.; Huycke, M.M., Gilmore, M.S. Virulence of enterococci. **Clin Microbiol Ver.**v.7, p.462-78, 1994.
- Jhajharia, K. et al. Biofilm in endodontics: A review. **J. Int. Soc. Prev. Community Dent.** 5, 1-12, 2015.
- Jia, K.; Ionescu, R.E. Measurement of Bacterial Bioluminescence Intensity and Spectrum: Current Physical Techniques and Principles. **In: Thouand G, Marks R. Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology.** v.3, p.25- 51, 2015.
- Takehashi, S.; Stanley, H.R.; Fitzgerald, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.**v.20. n.3, p.340-349,1965.
- Khalifa, L. et al. Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. **J. Oral Microbiol.** v.8, n.1,2016.
- Khalifa, L. et al. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. **Appl Environ Microbiol.** v.81, p.2696-705,2015.
- Khalifa, L. et al. Defeating Antibiotic- and Phage-Resistant *Enterococcus faecalis* Using a Phage Cocktail in Vitro and in a Clot Model. **Front. Microbiol.** v.9, p.326, 2018.
- Knowles, B. et al. Lytic to temperate switching of viral communities. **Nature.** v.531, p.466-470, 2016.
- Koskella, B.; Meaden, S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. **Viruses.** v.5, n.3, p.806-823, 2013.
- Kristich, C.J.; Rice, L.B.; Arias, C.A. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. **Massachusetts Eye and Ear Infirmary:** Boston, MA, USA.2014.
- Kropinski, A.M. Phage therapy – everything old is new again. **Can J Infect Dis Med Microbiol.** v.17, p.297-306, 2006.
- Kumar, L., Cox, C., Sarkar, S. Matrix metalloprotease-1 inhibits and disrupts *Enterococcus faecalis* biofilms. **Plos One.** v.14, n.1,p.1-18, 2019.
- Kuo, H. et al. Negligible-cost and weekend-free chemically defined human iPSC culture. **Stem Cells Report.**2020.

- Kutter, E.; De Vos, D., Gvasalia, G. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.11, p.69–86,2010.
- Lacerda, M.F.L.S. et al. Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. **Rev. bras. odontol.**v.73,n.3, p.212-217, 2016.
- Lana, M.A. et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiol Immunol.**v.16, p.100–5, 2001.
- Lazavera, E.B. et al. Efficacy of bacteriophages in complex treatment of patients with deep wounds. **Antibiot Khimioter.** v.46,n.1, p.10-4, 2001.
- Lee, D. et al. The Novel Enterococcus Phage vB_EfaS_HEf13 has broad lytic activity against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. **Front. Microbiol**, v.10, 2019.
- Lee, M. et al. Fluorescence change of *Fusobacterium nucleatum* due to *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Microbiology**. v.56, n.9, p.628-633, 2018.
- Leiman, P.G.; Arisaka, F.; Van Raaij, M.J. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. **Virology**. v.7, p. 55, 2010.
- Lenski, R. Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. **Advances in Microbial Ecology**. v.10, p.1–44,1988.
- Letkiewicz, S. et al. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis—Case report. **Folia Microbiol.** v.54, p.457–461, 2009.
- Lewis, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.4, p.999–1007, 2001.
- Lin, L.M. et al. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v.11, p.603-611, 1991.
- Liu, C.G. et al. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. **mBio**. v.11, e01462-20, 2020.
- Livermore, D.M. The threat from the pink corner. **Annals of Medicine**. v.35, p.226–234, 2003.
- Loc-Carrillo, C.; Abedon, S.T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**. v.1, p.111–114, 2011.
- Loeffler, J.M. Nelson, D.; Fischetti, V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. **Science**. v.294, p.2170–2172, 2001.
- Love, R.M. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**. v.34, p.399–405, 2001.
- Lowde, J.; Miller R.; Yahdi, M. Optimal control of vancomycin-resistant enterococci using preventive care and treatment of infections. **Mathematical Biosciences**. v.249,p.8-17, 2014.

- Lu, T.K.; Koeris, M.S. The next generation of bacteriophage therapy. **Current Opinion in Microbiology**. v.14, n.5, p.524–531, 2011.
- Lurz, R. et al. Structural organization of the head-to-tail interface of a bacterial virus. **Journal of Molecular Biology**. v.310, n.5, p.1027-37, 2001.
- Mann, H. The third age of phage. **PloS Biol**. v.3, n.5, p.182, 2005.
- Marks, T.; Sharp, R. Bacteriophages and biotechnology: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. Oxford, Oxfordshire.v.75, p.6–17, 2000.
- Marza, J.A. et al. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. **Burns**. v.32, p.644–646, 2006.
- Maurice, C. F. et al. Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons. **Environ Microbiol**. v.15, p.2463-75, 2013.
- Molander, A. et al. Microbiological status of rootfilled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**. v.31, p.1–7, 1998.
- Möller, Å.J.R. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **European Journal of Oral Sciences**. v.89, n.6, p.475–484, 1981.
- Mutnick, A.H.; Enne, V.; Jones, R.N. Linezolid resistance since 2001. Sentry Antimicrobial Surveillance Program. **Annals of Pharmacotherapy**. v.37, p.769–774, 2003.
- Nacif, M.C.A.M.; Alves, F.R.F. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Rev. bras. Odontol**, v.67,n.2, p.209-214, 2010.
- Nair, P.N.R. Light and electron microscopic studies on root canal flora and periapical lesions. **J Endod**, v.13, p.29–39, 1987.
- Nair, P.N.R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International Endodontic Journal**. v.39,n.4, p.249–281, 2006.
- Nakonieczna, A.; Cooper, C.J.; Gryko, R. Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v.119, n.3, p.620–631, 2015.
- Nelson, D.; Loomis, L.; Fischetti V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98, p.4107–4112, 2001.
- Nogales, A. et al. A Novel Fluorescent and Bioluminescent Bireporter Influenza. **Journal of Virology**. v.93, n.10,p.1-18, 2019.

Novik, G.; Ladutska, A.; Rakhuba, D. **Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs**. Formatex; Badajoz, Spain: 2017. Bacteriophage taxonomy and classification. p.251–259. (Microbiology Book Series N° 6)

Orlova E.V. (2012). Bacteriophages and their structural organization. In: Kurtboke I. (ed.) *Bacteriophages*. Rijeka, Croatia: *InTech*. 3-30. ISBN 9789535102724.

Paisano, A.F. et al. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Oral Microbiol. Immunol.** v.19,p. 327–330, 2004.

Paisano, AF. **Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de bacteriófagos em canais radiculares infectados por isolados clínicos de *Enterococcus faecalis*** [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

Peciulienė, V. et al. Microorganisms in root canal infections: a review. **Stomatologija**.v.10,n.1, p.4-9, 2008.

Peciulienė, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J** . v.34, p.429-434, 2001.

Pereira T.C. et al. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. **Clinical Oral Investigations**. 2018.

Plutzer B., Zilm P., Ratnayake J., & Cathro P. Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Australian Dental Journal**. v.63, n.2, p.208–216, 2018.

Rams, T.E. et al. Enterococci in human periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**. v.7, n.4, p.249–252, 1992.

Ricucci, D.; Siqueira, J.F. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J Endod**.v.36, n.8, p.1277-88, 2010.

Robertson, L.A. Beijerinck and the bioluminescent bacteria— microbiological experiments in the late 19th and early 20th centuries. **FEMS Microbiology Ecology**. v.75,p.185–194, 2011.

Rôças I.; Siqueira, Jr J.; Santos, K. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. **Journal of Endodontics**. v.30, n.5, p.315–320, 2004.

Ross, A.; Ward, S.; Hyman, P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. **Front. Microbiol.** v.7, p.1352, 2016.

Saatchi, M. et al. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Applied Oral Science**. v.22,n.5,p.356–365, 2014.

- Sánchez-Sanhueza, G.; González-Rocha, G.; Bello-Toledo, H. *Enterococcus* spp. isolated from root canals with persistent chronic apical periodontitis in a Chilean population. *Braz. J. Oral Sci.* v.14, 2015.
- Sedgley, C.; Buck, G.; Appelbe, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J. Endod.* v.32, p.104–9, 2006.
- Shuping, G.B. et al. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* v.26, p.751–755, 2000.
- Siqueira, J.F. Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.94, p.281-293, 2002.
- Siqueira, J.F.; Lopes, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* v.32, n.5, p.361-9, 1999.
- Siqueira, J.F. et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J.* v.30, p.279–82, 1997.
- Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res.* v.88, n.11, p.969-81, 2009.
- Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Microbiology of Apical Periodontitis. *Essential Endodontology.* p.91–142, 2019.
- Sjogren U. et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal.* v.30, p.297–306, 1997.
- Sjogren, U. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* v.24, p.119-125, 1991.
- Slopek, S. et al. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz).* v.35, p.569–583, 1987.
- Song, K. Classifying the Lifestyle of Metagenomically-Derived Phages Sequences Using Alignment-Free Methods. *Frontiers in Microbiology.* v.11, 2020.
- Sood S. et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res.* v.128, p.111–121, 2008.
- Souza, M.A. et al. Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis* – An in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* v.23, p.347–352, 2018.
- Spellberg, B. et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical Infectious Diseases.* v.38, p.1279–1286, 2004.

Steier, L.; Oliveira S.; Figueiredo, J.A.P. Bacteriophages in Dentistry—State of the Art and Perspectives. *Dent. J.* v.7,n.6, 2019.

Stern, A.; Sorek, R. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *BioEssays.* v.33, p.43–51, 2011.

Stewart, P.S.; Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* v.358, p.135–138, 2001.

Streptomycin in Tuberculosis Trials Committee. Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis: a Medical Research Council investigation. *British Medical Journal.* v.2,n.4582, p.769–782, 1948.

Sundqvist G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.85, p.86–93, 1998.

Sundqvist, G.; Johansson, E.; Sjogren, U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endodon.*v.15,p.13–9, 1989.

Svensater, G.; Bergenholtz, G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics.* v.9,n.1, p.27–36, 2004.

Szafranski, S.P.; Winkel, A.; Stiesch, M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J. Biotechnol.* v.250, p.29-44, 2017.

Takahashi, N. et al. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol.*v.12, p.323-28, 1997.

Theuretzbacher, U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *International Journal of Antimicrobial Agents.* v.39, p.295–299, 2012.

Thurber, R. Current insights into phage biodiversity and biogeography. *Current Opinion in Microbiology.* v.12, p.582–587, 2009.

Tinoco, J.M. et al. Antibacterial effect of genetically-engineered bacteriophage ϕ Efl1/ ϕ FL1C(Δ 36) PnisA on dentin infected with antibiotic- resistant *Enterococcus faecalis*. *Arch. Oral Biol.* v.82, p.166-170, 2017.

Tinoco, J.M. et al. Effect of a genetically engineered bacteriophage on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Arch. Oral Biol.*v.71, p.80-86, 2016.

Twort, F.W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet.* v.186, p.1241–1243, 1915.

Van der Sluis L.W.M. et al. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *International Endodontic Journal.* v.40, n.6, p.415–426, 2007.

Vispo, N.; Puchades, Y. Bacteriófagos: de la terapia com fagos a la biologia combinatòria. *Biotechnol. Apl., La Habana.* v.8, n.3, p.135-147, 2001.

Von, Eiff, C.; Heilmann, C.; Peters, G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.18, p.843–846, 1999.

Walmagh M. et al. Characterization of five novel endolysins from gram-negative infecting bacteriophages. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.97, p.4369–4375, 2013.

Webber-Dabrowska B.; Mulczyk M.; Gorski, A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: na update od our institute's experience. **Arch.Immunol.Ther.Exp.** v.48, p.547-551, 2000.

Weinbauer, M.G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiol. Rev.** v.28, p.127–181, 2004.

Williamson, K.E.; Radosevich, M.; Wommack, K.E. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, p.3119–3125, 2005.

Wilson C.E. et al. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. **Int Endod J.**v.48, n.3, p.210-9, 2015.

Winter C., Smit A., Herndl G.J., & Weinbauer M.G. (2004) Impact of virio plankton on archaealand bacterial Community richness as assessed in seawater batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 804–813.


Wommack, K.E.; Colwell, R.R. Virioplankton, pp. viruses in aquatic ecosystems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.64, p.69–114, 2000.

World Health Organization Antimicrobial resistance. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. 2020.

Wright A. et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology* .v.34, n.4, p.349–357, 2009.

Zhang, W. et al. Genetic modifications to temperate *Enterococcus faecalis* phage O Efl1 taht abolish the establishment of lysogeny and sensitivity to repressor, and increase host range and productivity of lytic infection. **Microbiol.** v.159, p.1023-1035, 2013b.

ANEXO 1 – Lista de Projetos Aprovados pela Comissão de Pesquisa (COMPESQ) do ICBS


Sistema Pesquisa - Pesquisador: Marieli Chitolina Pradebon
[Retornar](#)

UFRGS

Projetos

Bolsas

Programa de Fomento à Pesquisa (Auxílio)

Dados Gerais:

Projeto Nº:	34070	Título:	UTILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU COMPARADAS AS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS TRADICIONAIS PARA O ESTUDO DA MICROBIOTA INTRARADICULAR DE DENTES COM PERIODONTITE APICAL	
Área de conhecimento:	Odontologia	Início:	02/01/2018	Previsão de conclusão: 31/12/2022
Situação:	Projeto em Andamento			
Origem:	Instituto de Ciências Básicas da Saúde Departamento de Ciências Morfológicas	Projeto Isolado		
Local de Realização:	não informado			
Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.				
Objetivo:	<p>É objetivo de o presente projeto avaliar a técnica de hibridização in situ comparada às técnicas microscópicas convencionais, de avaliação do biofilme, para estudar a infecção endodôntica em dentes com periodontite apical associada.</p>			

Palavras Chave:

MICROSCOPIA, PERIODONTITE APICAL

Equipe UFRGS:

Nome: JOSE ANTONIO POLI DE FIGUEIREDO

UFRGS

Projetos

Bolsas

Programa de Fomento à Pesquisa (Auxílio)

Equipe UFRGS:

Nome: JOSE ANTONIO POLI DE FIGUEIREDO
Coordenador - Início: 02/01/2018 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: THAIS MARCHAND RIBEIRO
Técnico: Assistente de Pesquisa - Início: 02/01/2018 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: Marieli Chitolina Pradebon
Ensino: mestrado - Início: 19/03/2019 Previsão de término: 30/04/2021

Avaliações:

Comissão de Pesquisa de Ciências Básicas da Saúde - **Aprovado** em 22/11/2017 [Clique aqui para visualizar o parecer](#)

Anexos:

[Projeto Completo](#) **Data de Envio:** 08/11/2017

Bolsas:

Projeto associado à bolsa PIBIC CNPq-UFRGS No Período: 01/08/2019 a 31/08/2020
Bolsista: THAIS MARCHAND RIBEIRO **no período de** 01/08/2019 a 31/08/2020

Solicitação de Bolsa:

Projeto associado à solicitação de bolsa na situação aprovada quanto ao mérito **no processo** IC2019