

FRANCISCO MONTAGNER

Cirurgião-Dentista

**COMUNIDADES MICROBIANAS EM CANAIS
RADICULARES E ABSCESSOS PERIAPICAIS AGUDOS E
SUSCETIBILIDADE DE ALGUMAS BACTÉRIAS
ANAERÓBIAS ESTRITAS ISOLADAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica, Área de Endodontia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Brenda P. F. A. Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

PIRACICABA

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

M76c

Montagner, Francisco.

Comunidades microbianas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos e suscetibilidade de algumas bactérias anaeróbias estritas isoladas / Francisco Montagner. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Rogério de Castilho Jacinto.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Reação em cadeia da polimerase. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Jacinto, Rogério de Castilho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Microbial communities in root canals and acute periradicular abscesses and antimicrobial susceptibility of some strict anaerobes

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Endodontics. 2. Polymerase chain reaction

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, Paulo Edelvar Correa Peres, Márcia da Silva Schmitz, Flaviana Bombarda Ferreira

Data da Defesa: 21-05-2010

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 21 de Maio de 2010, considerou o candidato FRANCISCO MONTAGNER aprovado.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Profa. Dra. MARCIA DA SILVA SCHMITZ

Profa. Dra. FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE FERREIRA

Prof. Dr. PAULO EDELVAR CORRÊA PERES

Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Resumo extenso

*Palavras que confortam,
exemplos que orientam,
distâncias que aproximam, e
abraços que acolhem.
Amor com simplicidade.
Minha família.*

Dedico ...

Aos meus pais, ***Jorge e Vera***, que acreditam em meus
sonhos, fazendo-os deles os seus.

Ao meu irmão ***Henrique***, por dividir os desafios da
caminhada da vida com companheirismo,
amizade e compreensão.

Senhor, fazei de mim um instrumento de Vossa Paz.

Agradeço...

A ***Deus***, fonte de sabedoria, paz e conforto, que nos protege nos momentos de dificuldade e nos concede Suas graças nos momentos de alegria.

Agradecimento especial...

A quem fornece caminhos e permite explorá-los,

A quem acredita e incentiva,

A quem dá exemplo e confiança,

A quem mostra a força para continuar trabalhando.

A quem ensina.

... a minha orientadora, ***Prof^a Dr^a Brenda P F A Gomes***, por despertar em mim o interesse pela pesquisa com seus exemplos de extrema dedicação e competência, minimizando as dúvidas, e permitindo que elas se tornassem um grande incentivo para meu crescimento e oportunizando a realização da minha caminhada.

Agradecimento especial...

... à ***Fernanda Signoretti***, minha grande irmã desta caminhada, presença incondicional nos momentos difíceis e na comemoração das conquistas, me presenteando sempre com seu conhecimento, competência e determinação.

Existem pessoas que encontramos, outras que nos são “encontradas” por Deus.

... a nossa família piracicabana, ***Seu Roque, Dona Zélia, João, Fernanda e Gustavo***, por nos darem suporte, amizade, tranquilidade, alegria e atenção, fazendo que nos sentíssemos acolhidos e felizes.

Agradeço...

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof Dr Francisco Haiter Neto**.

Ao **Prof Dr Jacks Jorge Júnior**, Coordenador dos Programas de Pós-graduação da FOP/UNICAMP, e à **Profa Dra Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Ao **Prof Dr Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela Área de Endodontia da FOP/UNICAMP.

Aos professores da Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Prof Dr Alexandre Augusto Zaia**, **Profa Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof Dr Caio César Randi Ferraz**, **Prof Dr Francisco José de Souza-Filho** e **Prof Dr José Flávio Affonso de Almeida**, que com sua competência e determinação, oportunizam o nosso crescimento profissional e pessoal, através de sua convivência e amizade.

Ao **Prof Dr Paulo E C Peres**, que com sua amizade e incentivo fizeram que o mundo da pesquisa se tornasse mais real, me presenteando com grandes lições de vida.

À **Profª Drª Márcia Schmitz**, que com sua amizade e confiança me mostra que ensinar na verdade é viver com dignidade e humildade.

Ao **Prof Dr Rogério Castilho de Jacinto**, co-orientador deste trabalho, por dividir sua experiência, estando sempre disposto a colaborar, compreendendo as dificuldades e estimulando a sua superação.

À **Profa Dra Purnima S Kumar**, da Área de Periodontia da *The Ohio State University – College of Dentistry*, por ter me recebido em seu laboratório e compartilhado seu conhecimento e amizade, demonstrando sempre atenção, entusiasmo e competência na realização de nossos trabalhos.

Ao **Adailton dos Santos Lima, Rubens Marques Paião, Ana Godoy e Wanderly Pavinatto** pela amizade e paciência, demonstradas através de sua

dedicação, proporcionaram a realização deste trabalho e, através de sua convivência tornaram-no mais agradável.

Ao **Prof Dr Dr José Flávio Affonso de Almeida, Profa Dra Márcia da Silva Schmitz** e à **Profa Dra Vanessa Bellocchio Berber Haddad** pelas contribuições e disponibilidade de correção prévia deste trabalho durante o Exame de Qualificação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por fornecer suporte financeiro durante o período de estágio, mestrado e doutorado.

*And its funny how it's the little things in life that mean the most
Not where you live what you drive or the price tag on your clothes
There's no dollar sign on a piece of mind; this I've come to know
So if you agree have a drink with me
Raise your glasses for a toast
To a little bit of FRIENDSHIP.*

[Adaptado de Zac Brown Band – Chicken Fried]

Agradeço...

... aos amigos do Laboratório de Endodontia da FOP-UNICAMP, ***Adriana de Jesus Soares, Ana Carolina Machado Rocha Lima Caiado, Ana Carolina Mascarenhas, Ana Lúcia Diefenbach, Ariane Marinho, Carlos Augusto Pantoja, Carlos Vieira, Danna Mota Moreira, Daniel Herrera Morante, Douglas Cecchin, Fernanda Tosello, Fernanda Freitas Lins, Frederico Canato Martinho, Geovânia Caldas Almeida, Giselle Priscilla Cruz Abi-Rached, Helena Rosa Campos Rabang, Joelson Brum, José Flávio Affonso de Almeida, Juliana Nascimento Santos, Juliana Melo, Karine Schell Nicastro, Letícia Nóbrega, Luciano Tavares Angelo Cintra, Máira Prado, Maraísa Greggio Delboni, Marcos Endo, Marcos Frozoni, Maria Raquel Monteiro, Morgana Eli Vianna, Naelka Sarmiento, Neylla Teixeira Senna, Rogério de Castilho Jacinto, Shaiana Tashi Kawagoe, Tétis Serejo Sauáia, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Bellato, Thaís Mageste Duque, Vanessa Bellocchio Berber e Wanderson Chiesa*** por fazerem o período que permanecemos aqui mais

agradável, contribuindo em diferentes momentos para que nos tornemos pessoas cada vez melhores.

... às alunas de Iniciação Científica **Priscilla Fortes, Marina Vieira Silveira Pereira, Katharina Wagner, Fernanda Chamosa Damore** e **Lia Zaiden Benatti** pela amizade e convivência.

... à **Mrs Ruth Flowers**, pelo exemplo de vida e dedicação, pelo suporte incansável, pela paciência, tornando o frio inverno de Columbus “*an awesome and funny holiday in the Grandma’s house*”.

... aos amigos do Laboratório de Periodontia da The Ohio State University, **Vinyak Joshi, Michael Brook, Malavika Tampi, Megan Fellows** e **Matt Mason** pela paciência e alegria com que dividiram seu tempo e amizade.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma
contribuíram para a realização deste trabalho e
contribuem para o meu contínuo e
crescimento pessoal.

“Sei que meu trabalho é uma gota d’água no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor.”

MADRE TERESA DE CALCUTÁ

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Isolamento Bacteriano: A) Cultura Primária: Placa de FAA contendo inoculo não-diluído, após 10 dias de incubação em cabine de anaerobiose. B) Cultura Primária: placa contendo inóculo diluído em 100 vezes. C) Cultura pura de *P. intermedia/nigrescens*. D) Detalhe da morfologia macroscópica das colônias de *P. intermedia/nigrescens*. Pág. 79
- Figura 2** Coloração de Gram (aumento x100): A) Coco Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*); B) Coco-bacilo Gram-negativo (*Prevotella intermedia/nigrescens*). Pág. 81
- Figura 3** Teste complementar de fluorescência sob luz UV. Pág. 81
- Figura 4** Extração do DNA Microbiano: A) Amostras clínicas; B) Componentes para lise celular do conjunto para Extração de DNA Quiagen®; C) Primeira incubação a 56°C em banho d'água; D) Amostras em banho d'água (2 horas); E) Segunda incubação (70°C, 10 min); F) Coluna para extração de DNA; G) Filtro contendo membrana de sílica para retenção do DNA; H) Centrífuga para remoção de líquidos e lavagem; I) Amostras posicionadas na centrífuga; J) Interior da coluna, contendo resíduos celulares e DNA; L) Resíduos celulares coletados para descarte; M) Soluções para lavagem e purificação do DNA extraído; N) Eluição do DNA em tubos; O) DNA extraído, suspenso em solução tampão. Pág. 84

- Figura 5** Etapas da Técnica de TRFLP: A) Extração do DNA microbiano. B) Reação de PCR com *primers* contendo moléculas fluorescentes. C) Fragmento de DNA bacteriano amplificado com fluoróforos. D) Digestão dos fragmentos com enzimas de restrição. E) Fragmentos terminais, produtos da reação de digestão. Pág. 87
- Figura 6** Preparo da reação de PCR: A) Reagentes empregados para a mistura da PCR: água milli-Q, tampão para enzima Taq DNA Polymerase, Cloreto de Magnésio, solução contendo dNTPs, enzima Taq DNA Polymerase; B) Primers empregados na reação. C) Mistura para reação de PCR. D) Distribuição da mistura para a reação de PCR nos microtubos contendo as amostras. E) Termociclador Pág. 90
- Figura 7** Visualização do produto da PCR: A) Adição de Brometo de etídeo à agarose. B) Agarose solidificada. C) Mistura do produto de reação ao corante. D) Inserção das amostras nos poços do gel de agarose. E) Fonte de eletroforese. F) Cuba de eletroforese. G) Visualização do gel e detecção da presença (bandas) ou ausência da espécie microbiana nas amostras de canal radicular (E) ou abscesso periapical (A). Pág. 92
- Figura 8** Suscetibilidade aos antimicrobianos pelo E-test. A) Placa com crescimento bacteriano de *P. intermedia/nigrescens* e fita de eritromicina, após 48 horas de incubação. B) Aumento da figura anterior, mostrando o ponto de intersecção (seta) entre o halo de inibição bacteriana e a fita de E-test. Pág. 100

| | | |
|------------------|---|----------|
| Figura 9 | Número de espécies (fragmentos terminais de restrição) em 20 pares de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais. Os pares de amostras estão conectados por linhas. | Pág. 107 |
| Figura 10 | Índice de diversidade de Shannon-Wiener em 20 pares de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais. Os pares de amostras estão conectados por linhas. | Pág. 108 |
| Figura 11 | Distribuição do número de espécies e índice de diversidade em amostras de canais radiculares (A e B) e abscessos periapicais (C e D), considerando o hábito de fumar, presença de dor prévia e características do exsudato durante a coleta. | Pág. 110 |
| Figura 12 | Média do número de fragmentos compartilhados em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais, de acordo com o fluoróforo empregado. | Pág. 111 |
| Figura 13 | Número médio de espécies compartilhadas e índice de similaridade de Bray-Curtis em amostras pareadas de canal e abscesso, considerando-se os fatores hábito de fumar e presença de dor prévia (*p<0.05). | Pág. 112 |
| Figura 14 | Proporção de microrganismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos isolados em amostras pareadas obtidas de canais radiculares e abscessos periapicais (n=20). | Pág. 113 |
| Figura 15 | Freqüência de espécies gram-positivas e gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em canais radiculares (A) e abscessos periapicais (B) em amostras pareadas. | Pág. 114 |

| | | |
|------------------|--|----------|
| Figura 16 | Distribuição de microrganismos isolados de canais radiculares e abscessos periapicais, considerando o número de espécies e o número de casos clínicos. | Pág. 115 |
| Figura 17 | Dendograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas através do método de cultura em amostras de canais radiculares. | Pág. 123 |
| Figura 18 | Dendograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas através do método de cultura em amostras de abscessos periapicais agudos. | Pág. 124 |
| Figura 19 | Dendograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas através dos métodos de PCR e Nested-PCR em amostras de canais radiculares, considerando as espécies selecionadas. | Pág. 125 |
| Figura 20 | Dendograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas detectadas através dos métodos de PCR e Nested-PCR em amostras de abscessos periapicais agudos. | Pág. 126 |
| Figura 21 | Dendograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas identificadas por cultura microbiana ou detectada através dos métodos de PCR e Nested-PCR em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos. | Pág. 127 |
| Figura 22 | Perfil dos microrganismos isolados quanto à suscetibilidade aos agentes antimicrobianos testados, em porcentagem. | Pág. 131 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|---------|
| Tabela 1 | Achados microbiológicos em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa espontânea, através do método de cultura microbiana. | Pág. 28 |
| Tabela 2 | Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de canais radiculares em dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa. | Pág. 34 |
| Tabela 3 | Achados microbiológicos em abscessos periapicais agudos, através do método de cultura microbiana. | Pág. 42 |
| Tabela 4 | Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de abscessos periapicais agudos. | Pág. 45 |
| Tabela 5 | Seqüências, temperatura de anelamento, comprimento do fragmento e referência para os nucleotídeos utilizados nas reações de PCR. | Pág. 89 |
| Tabela 6 | Espécies microbianas, primers, posição do gene 16S rRNA de ligação do primer, comprimento do fragmento amplificado e temperatura de anelamento referentes aos nucleotídeos utilizados nas reações de Nested-PCR. | Pág. 95 |
| Tabela 7 | Região de ligação, especificidade, direção de síntese e seqüência dos <i>primers</i> empregados para a detecção de <i>E. faecalis</i> através de Nested-PCR. | Pág. 97 |
| Tabela 8 | Valores interpretativos dos pontos de corte para determinação da suscetibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos testados de acordo com a metodologia estabelecida. | Pág. 99 |

| | | |
|------------------|--|----------|
| Tabela 9 | Freqüência de microrganismos anaeróbios estritos isolados em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais agudos. | Pág. 116 |
| Tabela 10 | Freqüência de microrganismos anaeróbios facultativos e fungo isolados em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais agudos. | Pág. 117 |
| Tabela 11 | Freqüência de espécies microbianas detectadas em amostras pareadas de canais radiculares (n=20) e abscessos periapicais agudos (n=20), através do método de PCR. | Pág. 119 |
| Tabela 12 | Freqüência de espécies microbianas detectadas em amostras pareadas de canais radiculares (n=20) e abscessos periapicais agudos (n=20), através do método de <i>Nested-PCR</i> | Pág. 120 |
| Tabela 13 | Freqüência e detecção simultânea de espécies microbianas em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos, através dos métodos de Cultura e PCR. | Pág. 122 |
| Tabela 14 | Freqüência de cepas resistentes isoladas em canais radiculares e abscessos periapicais de 20 pacientes portadores de necrose pulpar e abscesso periapical agudo.. | Pág. 129 |
| Tabela 15 | Valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e suscetibilidade dos microrganismos pertencentes aos gêneros <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Fusobacterium</i> e <i>Peptostreptococcus</i> isolados de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais (n=51). | Pág. 130 |

| | | |
|------------------|--|----------|
| Tabela 16 | Comparação da suscetibilidade das cepas isoladas de canais radiculares e abscessos periapicais em amostras pareadas frente aos antibióticos testados. | Pág. 132 |
| Tabela 17 | Valores médios de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero <i>Prevotella</i> produtoras de pigmento negro isoladas em canais radiculares (n=4) ou abscessos periapicais (n=4) frente aos agentes antimicrobianos. | Pág. 134 |
| Tabela 18 | Valores médios de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero <i>Prevotella</i> não-pigmentadas, isoladas em canais radiculares (n=13) ou abscessos periapicais (n=8) frente aos agentes antimicrobianos. | Pág. 135 |
| Tabela 19 | Valores médios de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero <i>Peptostreptococcus</i> , isoladas em canais radiculares (n=9) ou abscessos periapicais (n=4) frente aos agentes antimicrobianos. | Pág. 136 |
| Tabela 20 | Valores médios de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero <i>Porphyromonas</i> , isoladas em canais radiculares (n=4) ou abscessos periapicais (n=2) frente aos agentes antimicrobianos. | Pág. 137 |

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram caracterizar as comunidades microbianas presentes em canais radiculares (CR) com necrose pulpar e abscessos periapicais agudos (APA) de amostras pareadas, e determinar *in vitro* a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas isoladas através do método de E-test. Coletas microbiológicas de 20 CR e 20 amostras de exsudatos de APA dos mesmos pacientes foram processadas e caracterizadas empregando-se métodos de análise do polimorfismo do fragmento terminal de restrição (APFTR), cultura microbiana e testes bioquímicos, PCR e Nested-PCR. Os dados foram analisados estatisticamente, de acordo com suas características. Amostras de CR e APA não diferiram no número de microrganismos ou diversidade de suas comunidades quando avaliadas através da técnica de APFTR. Poucas espécies foram detectadas simultaneamente nos ecossistemas correlacionados. Nenhuma espécie foi detectada em todas as amostras, e a maioria foi detectada em apenas uma amostra. A técnica da cultura microbiana demonstrou predomínio de anaeróbios estritos pertencentes ao gênero *Prevotella* spp. e às espécies *Parvimonas micra*, *Gemella morbillorum* e *Bacteroides ureolyticus* em ambos ecossistemas. As espécies *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis*, *T. socranskii* e *T. denticola* foram freqüentemente detectados nos CR e APA, através do PCR ou Nested-PCR. *E. faecalis* foi detectado em CR em uma única amostra. Em 45% dos casos, observou-se a presença de ao menos uma cepa resistente a um ou mais agentes antimicrobianos testados. Amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e penicilina G foram os antibióticos mais efetivos, enquanto que maiores níveis de resistência foram observados para eritromicina e azitromicina. As cepas isoladas dos APA demonstraram valores inferiores de CIM quando comparadas àquelas isoladas em CR, exceto para a penicilina G. Comunidades microbianas com perfis heterogêneos foram observadas em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, de um mesmo paciente.

Os microrganismos isolados em ambos os ecossistemas revelaram padrões não similares de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos mais prescritos em Endodontia.

PALAVRAS-CHAVES: microrganismos, comunidades microbianas, infecção endodôntica primária, canal radicular, abscesso periapical agudo, cultura microbiana, APFRT, PCR, Nested PCR, E-test.

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the profile of microbial communities in necrotic root canals (RC) and acute periradicular abscesses (AP) in paired samples. The antimicrobial susceptibility was determined with E-test for strict anaerobes. Paired samples of RC and PA exudates were collected from 20 subjects and analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism (t-RFLP), microbial culture, PCR, and Nested-PCR. Statistical analysis was performed. RC and PA were not different in the number of species or in the community diversity, however very few species were shared between the two communities. No single t-RF fragment was detected in all samples, and the majority was detected in only one sample. Strict anaerobes were frequently isolated in RC and PA samples, comprising the genus *Prevotella* spp., and the species *Parvimonas micra*, *Gemella morbillorum* e *Bacteroides ureolyticus* species. *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis*, *T. socranskii* e *T. denticola* were frequently detected in the RC and PA. Only one RC sample harbored *E. faecalis* which was detected with molecular methods. The E-test showed that at least one resistant strain was isolated from 45% of the subjects. Amoxicilin, amoxicilin + clavulanic acid and penicilin-G were the most effective antimicrobial agents, and high resistance levels were observed for erythromycin and azithromycin. PA isolates had lower MIC than RC strains, except for pennicilin-G. In conclusion, the microbial profiles of the RC and PA communities are distinct and diverged between all subjects. The heterogeneous profiles RC and PA produced microbial interactions that affected the susceptibility to the most frequently prescribed antimicrobial agents in Endodontics.

KEY WORDS: microorganisms, microbial communities, primary endodontic infections, root canal, acute periradicular abscess, microbial culture, TRFLP, PCR, Nested PCR, E-test.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|---------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | Pág. 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | Pág. 5 |
| 2.1 | Aspectos Epidemiológicos Relacionados às Infecções Odontogênicas Agudas de Origem Endodôntica | Pág. 5 |
| 2.2 | Diagnóstico Clínico e Classificação das Infecções Odontogênicas Agudas de Origem Endodôntica | Pág. 7 |
| 2.3 | O Estabelecimento da Infecção Endodôntica no Sistema de Canais Radiculares e nos Tecidos Periapicais | Pág. 12 |
| 2.4 | Métodos de Estudo da Infecção Endodôntica | Pág. 17 |
| 2.4.1 | Método de Cultura Microbiana | Pág. 17 |
| 2.4.2 | Métodos de Identificação Molecular | Pág. 19 |
| 2.5 | Microbiota das Infecções Endodônticas Primárias Associadas à Sintomatologia Dolorosa Espontânea..... | Pág. 25 |
| 2.5.1 | Microbiota do Canal Radicular em Infecções Primárias Associadas à Sintomatologia Dolorosa | Pág. 25 |
| 2.5.2 | Microbiota do Abscesso Periapical Agudo | Pág. 39 |
| 2.6 | Terapia Antimicrobiana em Endodontia | Pág. 50 |
| 2.6.1 | Desenvolvimento de Resistência aos Agentes Antimicrobianos | Pág. 56 |
| 2.6.2 | Avaliação de Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos e sua Aplicação Clínica | Pág. 59 |

| | | |
|-------|--|----------|
| 3 | PROPOSIÇÃO | Pág. 69 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | Pág. 71 |
| 4.1 | Seleção dos Indivíduos | Pág. 71 |
| 4.2 | Aspectos Clínicos e Radiográficos | Pág. 71 |
| 4.3 | Coleta das Amostras | Pág. 72 |
| 4.3.1 | Canal Radicular | Pág. 72 |
| 4.3.2 | Abscesso Periapical | Pág. 74 |
| 4.3.3 | Prescrição de Agentes Antimicrobianos | Pág. 74 |
| 4.3.4 | Acompanhamento dos Pacientes | Pág. 75 |
| 4.4 | Caracterização da Microbiota do Canal Radicular e do Abscesso Periapical | Pág. 75 |
| 4.4.1 | Método de Cultura Microbiana | Pág. 76 |
| 4.4.2 | Extração do DNA Microbiano | Pág. 82 |
| 4.4.3 | Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição – (<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) | Pág. 85 |
| 4.4.4 | Técnica de PCR | Pág. 87 |
| 4.4.5 | Técnica de Nested-PCR | Pág. 93 |
| 4.5 | Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana dos Isolados dos Canais Radiculares – E-test | Pág. 98 |
| 4.6 | Análise Estatística | Pág. 101 |
| 5 | RESULTADOS | Pág. 105 |
| 5.1 | Características Clínicas | Pág. 105 |
| 5.2 | Características das Comunidades Microbianas | Pág. 106 |

| | | |
|-------|---|----------|
| 5.2.1 | Análise do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento Terminal de Restrição | Pág. 106 |
| 5.2.2 | Método de Cultura Microbiana | Pág. 113 |
| 5.3 | Detecção de Microrganismos anaeróbios estritos e <i>Enterococcus faecalis</i> através de Métodos Moleculares | Pág. 118 |
| 5.3.1 | PCR | Pág. 118 |
| 5.3.2 | Técnica de <i>Nested-PCR</i> para a Detecção de <i>Treponema spp.</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> | Pág. 119 |
| 5.3.3 | Comparação da Sensibilidade das Técnicas de Cultura Microbiana e PCR | Pág. 121 |
| 5.4 | Similaridade das Comunidades Microbianas de Canais radiculares e Abscessos Periapicais Identificadas através dos Métodos de Cultura Microbiana e Moleculares pela Análise de Clusters | Pág. 122 |
| 5.5 | Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos (E-test) | Pág. 128 |
| 6 | DISCUSSÃO | Pág. 139 |
| 6.1 | Características das Comunidades Microbianas em Infecções Endodônticas de Canais Radiculares e Abscessos Periapicais Agudos | Pág. 139 |
| 6.1.1 | Técnica do Polimorfismo do Fragmento Terminal de Restrição | Pág. 139 |
| 6.1.2 | Técnica de Cultura Microbiana e Identificação Bioquímica | Pág. 143 |
| 6.2 | Detecção de Microrganismos Através de PCR e <i>Nested-PCR</i> | Pág. 149 |
| 6.3 | Similaridade de Perfis Microbianos em Amostras de Canais Radiculares e Exsudatos Periapicais em Infecções Endodônticas Primárias Sintomáticas | Pág. 158 |
| 6.4 | Suscetibilidade dos Isolados Clínicos aos Agentes Antimicrobianos | Pág. 159 |
| 6.5 | Considerações Finais | Pág. 166 |
| 7 | CONCLUSÃO | Pág. 169 |

| | |
|-------------------|----------|
| REFERÊNCIAS | Pág. 171 |
| ANEXO | Pág. 203 |
| APÊNDICES | Pág. 205 |

1 INTRODUÇÃO

O sistema de canais radiculares em dentes com necrose pulpar constitui um nicho ecológico complexo que propicia condições adequadas para o desenvolvimento da infecção endodôntica (Sundqvist, 1992) e pode ser a fonte de microrganismos causadores das infecções extra-radiculares (Bergenholtz, 1974; Möller *et al.*, 1981). O número elevado de células microbianas e com habilidade de invadir tecidos, associado à supressão momentânea da resistência do hospedeiro, permite o estabelecimento de uma infecção aguda nos tecidos periapicais. As interações microbianas (Gharbia & Shah, 1993), as pressões exercidas pelo ambiente (Haapasalo, 1993) e o contínuo desafio proporcionado pela ação do sistema imune humano (Ziembuhr *et al.*, 1999) restringem o número de espécies capazes de colonizar estes ecossistemas.

A partir dos anos 70, o aprimoramento das técnicas de coleta e isolamento de microrganismos através do desenvolvimento de meios de cultura, meios de transporte e métodos de identificação mais precisos e rápidos permitiram a detecção de uma gama variada de espécies, ampliando a população de espécies associadas com o desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais. Além disso, a cultura de microrganismos permite a realização de testes de suscetibilidade dos patógenos aos agentes antimicrobianos (Siqueira & Roças, 2005a) e ainda possibilita o estudo da fisiopatologia das espécies microbianas (Shah & Gharbia, 1993).

A introdução de métodos moleculares de diagnóstico, baseada na detecção de seqüências de ácidos nucleicos, representou uma ferramenta importante para a identificação de patógenos e para determinação da posição taxonômica dos microrganismos, complementando os resultados obtidos através do método de cultura microbiana (Song, 2005). A detecção de espécies associadas às infecções endodônticas tem sido realizada através da amplificação

de regiões do gene 16S rRNA através da reação em cadeia da enzima polimerase (ou *Polymerase Chain Reaction*) e através da hibridização direta do DNA bacteriano a uma sonda de DNA. Existem métodos que permitem a quantificação de ácidos nucléicos ou ainda a caracterização de comunidades microbianas complexas. O número de novos protocolos ou mesmo variações de técnicas têm aumentado a cada dia e apresentam vantagens e limitações.

A infecção endodôntica primária é constituída principalmente por microrganismos anaeróbios estritos, sendo alguns de difícil cultivo, ainda não cultivados e mesmo desconhecidos (Gomes *et al.*, 2004; Rôças *et al.*, 2005a; Sakamoto *et al.*, 2006). Sua composição está relacionada à presença ou não do desenvolvimento de sintomatologia dolorosa (Yoshida *et al.*, 1987). Estudos demonstram que espécies pertencentes aos gêneros *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., e *Treponema* spp. e clones de microrganismos orais ainda não caracterizados são freqüentemente detectadas nessas infecções (Yoshida *et al.*, 1987; Hashioka *et al.*, 1992; Munson *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2009). Os métodos moleculares sugerem a presença de comunidades microbianas únicas em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos (Munson *et al.*, 2002; Machado de Oliveira *et al.*, 2007; Jacinto *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2009), influenciada por fatores geográficos e populacionais (Rôças *et al.*, 2006a).

O tratamento das infecções orofaciais de origem endodôntica consiste na eliminação da origem de contaminação através da terapia endodôntica e da drenagem cirúrgica da coleção purulenta (Flynn, 2000). Agentes antimicrobianos podem ser empregados como adjuvantes nesta terapia, principalmente em pacientes nos quais se observa sinais e sintomas que denotam disseminação sistêmica do processo infeccioso (Wynn & Bergman, 1994; Andrade & Souza-Filho, 2006). O uso contínuo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado um desenvolvimento crescente de resistência, originando patógenos panresistentes, tornando este um problema global (Owens Jr, 2008a;

Hawkey, 2008; Handal & Olsen 2000). Assim, torna-se imprescindível a realização periódica de testes laboratoriais para detectar e monitorar continuamente a suscetibilidade desses microrganismos (Wexler, 1993; Van Steenberg *et al.*, 1993), além da caracterização dos perfis de resistência em infecções relacionadas, como em canais radiculares e abscessos periapicais agudos. Os padrões internacionais para teste de suscetibilidade dos microrganismos anaeróbios são determinados através dos métodos de diluição em caldo, diluição em Agar e o Epsilometer Test (E-test), tendo como objetivo determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de um antibiótico para os isolados clínicos (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*, 2007).

Não são observados na literatura estudos que descrevem a diversidade e a estrutura microbiana em infecções endodônticas de ecossistemas relacionados, como canais radiculares com polpa necrótica e abscessos periapicais agudos. Torna-se necessária a ampla caracterização das comunidades que se estabelecem nesses microbiomas e a determinação dos padrões de suscetibilidade das bactérias anaeróbias estritas frente aos antimicrobianos freqüentemente prescritos em Endodontia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS ÀS INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS AGUDAS DE ORIGEM ENDODÔNTICA

As infecções odontogênicas são consideradas um problema de saúde pública e uma causa de mortalidade na população, embora os seus métodos de prevenção e controle sejam conhecidos (Chaves, 1986).

Poucos estudos descrevem a relação entre o gênero do paciente e a incidência de infecções odontogênicas. Alguns autores não observaram diferenças na incidência entre os gêneros (Flynn *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2009), enquanto outros reportam uma predileção por pacientes do gênero masculino (Kannangara *et al.*, 1980; Dodson *et al.*, 1989; Stroe *et al.*, 2001).

De acordo com a faixa etária, estudos demonstram uma maior prevalência da doença em pacientes que se encontram na terceira década de vida (Kannangara *et al.*, 1980; Stroe *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2009). Stroe *et al.* (2001) relataram uma variação de 3 a 56 anos em pacientes atendidos durante a década de 80 e de 3 a 83,3 anos nos pacientes da década de década de 90.

De acordo com as condições sócio-econômicas, Huag *et al.* (1991) descreveram uma maior incidência desta afecção em minorias populacionais, pertencentes aos grupos afro-americano, asiáticos e hispânicos no estado de Ohio, nos Estados Unidos da América. Sato *et al.* (2009) relataram que não houve predileção por raça para a ocorrência de infecções odontogênicas, considerando-se a proporção dos grupos étnicos que constituem a população brasileira.

Em relação ao número de atendimentos, Thomas *et al.* (2008) observaram um aumento na taxa de internações hospitalares para tratamento de abscessos odontogênicos. Dentre os motivos relatados, encontram-se a diminuição da procura por atendimento odontológico, justificada pelo elevado preço do tratamento e pelo número inferior de profissionais que atuam no sistema público, reduzindo o atendimento gratuito à população.

Burnham *et al.* (2010) constataram que a alteração de políticas governamentais de acesso a serviços odontológicos pode ser a responsável pelo aumento drástico no número de pacientes internados e que necessitaram de intervenções hospitalares para o tratamento de infecções odontogênicas graves no Reino Unido, no período de 2003 a 2006.

Em relação ao curso das infecções orofaciais, Boykin *et al.*, (2003) acompanharam e entrevistaram 873 indivíduos com o objetivo de determinar a necessidade de procedimentos endodônticos em uma população, no período de 48 meses. A presença de dor causada por infecções endodônticas foi responsável por 30% dos atendimentos de urgência. Flynn *et al.* (2006) relataram que as infecções dos canais radiculares foram a causa de 65% das infecções severas da região de cabeça e pescoço.

Sato *et al.* (2009) avaliaram os prontuários clínicos de pacientes que apresentavam infecções orofaciais e que foram atendidos pelo Serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) no período de 1999 a 2007. Observou-se que 79,31% infecções eram de origem odontogênica, seguido de infecções associadas aos casos de traumatismos faciais.

As infecções odontogênicas podem se originar também após a realização de um tratamento odontológico. Seppänen *et al.* (2008) avaliaram 35 pacientes que apresentavam infecções odontogênicas graves nesta condição.

Houve uma predominância de infecções localizadas, que surgiram principalmente após a realização de exodontias e tratamentos endodônticos.

Wong (1999) realizou uma pesquisa na Tailândia para determinar a incidência de óbitos causados por infecções odontogênicas em um período de 3 anos. A taxa de óbitos foi aproximadamente 1 em 150 casos atendidos nos hospitais tailandeses. Houve uma predileção para pacientes com mais de 40 anos, imunocomprometidos ou diabéticos.

Considerando-se as características populacionais associadas à ocorrência de infecções odontogênicas agudas de origem endodôntica, modulada por fatores sócio-econômicos, torna-se importante definir e reconhecer as características clínicas que determinam o seu diagnóstico e evolução.

2.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E CLASSIFICAÇÃO DAS INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS AGUDAS DE ORIGEM ENDODÔNTICA

O propósito inicial do diagnóstico das infecções odontogênicas agudas é determinar a sua gravidade (Peterson, 2005). Estruturalmente, o diagnóstico consiste em ouvir o paciente (obtenção de dados subjetivos) e examiná-lo (coleta de dados objetivos) (Costa Filho, 2004; Reit *et al.*, 2006).

Considera-se inicialmente a queixa principal do paciente, onde ele relata o motivo pelo qual procurou o atendimento (Peterson, 2005). A dor é o principal motivo relatado pelos pacientes que apresentam infecções odontogênicas (Campanelli *et al.*, 2008), seguido da presença de alterações locais tais como edema (Sato *et al.*, 2009) e disfunções (trismo ou disfagia) (Sato *et al.*, 2009) além da presença de febre ou mal-estar (Storoe *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2009).

A evolução do processo infeccioso é constatada através de questionamentos para determinar o início da infecção, sua duração e a rapidez da progressão do quadro clínico (Peterson, 2005). Ao avaliarem o tempo entre o início da infecção e a presença de disfunções em pacientes que apresentavam infecções odontogênicas, Seppänen *et al.* (2008) constataram que a média de dias para o surgimento de alterações locais foi de 14 dias (variando de 0 a 93 dias) e para a manifestação de complicações sistêmicas foi de 26 dias (variando de 0 a 52 dias). Por outro lado, Sato *et al.* (2009) relataram que o tempo médio entre o início da sintomatologia e o atendimento do paciente foi de 8,2 dias.

A história médica pregressa deve ser obtida de modo comum, por entrevista ou questionário, para preenchimento pelo paciente (Peterson, 2005). Algumas patologias ou hábitos podem influenciar a progressão das infecções endodônticas. As doenças sistêmicas mais comumente relatadas são imunossupressão, associada ao diabetes tipo II e ao vírus HIV, além de hábitos como o fumo (41% dos pacientes) (Flynn *et al.*, 2006). Seppänen *et al.* (2008) relatam que pacientes inicialmente saudáveis apresentam infecções restritas às áreas do complexo maxilofacial, enquanto pacientes com doenças sistêmicas têm uma tendência maior a desenvolverem infecções que originam complicações sistêmicas.

O exame físico do paciente inicia-se através da coleta dos sinais vitais, como a temperatura, pressão sangüínea, taxa de pulso e taxa respiratória (Peterson, 2005). Campanelli *et al.* (2008) não detectaram alterações nos sinais vitais dos 30 pacientes avaliados com necrose pulpar e abscessos periapicais agudos localizados foram avaliados. Entretanto, quando as infecções odontogênicas envolvem espaços fasciais profundos, alterações na temperatura corporal (entre 37,62°C e 37,76°C) e na contagem de células brancas no hemograma podem ser observadas (Storoe *et al.*, 2001).

O exame físico extra-oral abrange a inspeção de áreas da cabeça e pescoço do paciente, em busca de sinais de infecção, tais como evidências de tumefação, eritemas e disfunção (Peterson, 2005).

O exame intra-oral tem como objetivo identificar a causa da infecção (Peterson, 2005). Dentre os recursos semiotécnicos para o diagnóstico das alterações pulpares e periapicais, encontram-se o teste de sensibilidade ao frio, o teste de percussão vertical, o teste de palpação dos tecidos periapicais. Dentre os grupos dentais, os molares são os dentes mais freqüentemente associados às infecções odontogênicas que apresentam disseminação para espaços fasciais (Obayashi *et al.*, 2004; Seppänen *et al.*, 2008). Em casos de necrose pulpar, a resposta do teste de sensibilidade ao frio é negativa (Leonardo & Lia, 2005). A presença de sensibilidade ou dor à percussão vertical indica um processo inflamatório intenso decorrente da extensão da infecção aos tecidos do ligamento periodontal apical (Costa Filho, 2004; Siqueira *et al.*, 2004a). A sensibilidade à palpação da mucosa da região periapical e fundo de sulco auxilia na determinação da localização da infecção, quando esta atinge os tecidos submucosos (Souza-Filho *et al.*, 2002).

As alterações periapicais agudas associadas à necrose pulpar são a periodontite apical aguda e o abscesso periapical agudo. Gutmann *et al.* (2009) avaliaram a literatura relacionada aos termos empregados para a denominação das condições periapicais/perirradiculares nos estados de saúde e doença. Periodontite apical aguda caracteriza-se por sensibilidade à percussão e durante o ato de ocluir. Entretanto, um elemento dental com abscesso periapical agudo apresenta-se com dor intensa espontânea e necrose pulpar. O edema pode ou não estar presente, localizando-se na área muco-gengival ou envolvendo planos e espaços fasciais. A dor à percussão vertical é intensa e o dente pode apresentar graus variáveis de mobilidade.

Considerando os aspectos clínicos, diferentes denominações podem ser dadas às fases evolutivas dos abscessos periapicais agudos, dependendo do critério de classificação.

De acordo com Souza-Filho *et al.* (2002), os abscessos periapicais podem ser classificados em abscessos localizados no ápice radicular, na região sub-perióstea, ou na região submucosa. Os abscessos restritos ao espaço anatômico apical e que não atingem o espaço subperiosteal não promovem resposta ao teste de palpação e não apresentam aumento de volume da região. O paciente apresenta dor contínua, pulsátil e localizada. Na condição de abscesso sub-periósteo, o exsudato purulento está localizado na interface entre o osso e o periosteio. Não há presença de edema, e observa-se uma pequena elevação nas proximidades da região apical, gerando sensibilidade durante o exame de palpação. Entretanto, quando o exsudato purulento rompe o periosteio e atinge os tecidos periapicais, induz a formação de intensa reação inflamatória e imediata formação de edema. Ocorre então o estabelecimento do abscesso periapical localizado na região submucosa, podendo ser localizado ou difuso. Os autores relatam que esta classificação não representa entidades patológicas independentes e sim, estágios evolutivos das reações agudas periapicais.

Siqueira *et al.* (2004a) não estabelecem uma divisão para a classificação dos abscessos periapicais agudos, de acordo com localização ou mesmo estágio de evolução.

Leonardo & Lia (2005) classificam os abscessos de acordo com seu estágio em inicial, em evolução e evoluído. Segundo os autores, na fase clínica inicial a infecção está localizada nas imediações da região apical, e o paciente apresenta dor espontânea, intensa e pulsátil, extrusão dental e extrema sensibilidade à percussão vertical. Na fase clínica “em evolução”, observa-se alteração do volume facial, o paciente apresenta edema firme e aquecido, onde não se observa ponto de flutuação. Pode haver diminuição da intensidade da dor,

quando comparada à fase inicial. Febre, trismo, astenia, cefaléia e prostração estão presentes. Quando o abscesso periapical agudo está na fase de “evoluído”, o paciente apresenta uma regressão dos sintomas e o edema está duro e aquecido. Apresenta também uma área definida caracterizada pela concentração de pus com ponto de flutuação.

A infecção no tecido ósseo medular tende a atingir a lâmina cortical do processo alveolar, perfurando-a e dirigindo-se para os tecidos moles, dependendo da posição anatômica do elemento dental (Birn, 1972). A menor espessura da cortical vestibular nos arcos superior e inferior justifica a freqüente presença de edema no fundo de sulco vestibular (Obayashi *et al.*, 2004; Peterson, 2005). Obayashi *et al.* (2004) estudaram as vias de disseminação de infecções odontogênicas na maxila através de tomografia computadorizada. Os espaços fasciais que podem ser acometidos por infecções em dentes superiores são o bucal, o mastigatório e o parafaríngeo. Nos dentes inferiores, quando a via de drenagem envolve a região lingual, a relação dos ápices dentais com a inserção do músculo miloióide determina se a infecção irá se dirigir para os espaços sublingual ou submandibular (Peterson, 2005).

A disseminação da infecção periapical pode originar quadros clínicos graves, tais como Angina de Ludwig (Srirompotong & Art-Smart, 2003), trombose do seio cavernoso (Zachariades *et al.*, 2005), comprometimento do trato respiratório e envolvimento do mediastino (Pappa & Jones, 2005), sepse e óbito (Carter & Lowis, 2007).

De acordo com Peterson (2005), o diagnóstico da extensão da infecção odontogênica permite a identificação da necessidade de tratamento especializado ou hospitalização. Os critérios que determinam a gravidade da infecção são: progressão rápida, dificuldade de respiração e deglutição, envolvimento dos espaços fasciais, temperatura corporal elevada (acima de 38°C), trismo acentuado

(menos de 10 milímetros de abertura bucal), aparência tóxica ou comprometimento das defesas do hospedeiro.

Exames de imagem abrangem radiografias intra-orais, extra-orais, além de tomografias computadorizadas e ressonâncias magnéticas (Obayashi *et al.*, 2004). Em radiografias periapicais, quando o abscesso se desenvolve pela agudização de um processo crônico pré-existente, há presença de área radiolúcida periapical. Entretanto, quando o processo supurativo se desenvolve como extensão direta da necrose e infecção pulpar, verifica-se apenas um espessamento do espaço do ligamento periodontal apical (Siqueira *et al.*, 2004a). Tomografias computadorizadas e ressonâncias magnéticas são ferramentas importantes para a avaliação do comprometimento de espaços fasciais profundos (Schuknecht *et al.*, 2008).

Determinados os parâmetros e características clínicas para o diagnóstico dos abscessos periapicais agudos, torna-se necessário descrever a origem e o estabelecimento da infecção aguda que acomete o sistema de canais radiculares e os tecidos perirradiculares.

2.3 O ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO ENDODÔNTICA NO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E NOS TECIDOS PERIAPICAIS

Em um paciente saudável, há proporcionalmente dez vezes mais bactérias do que células (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004). Os microrganismos comensais têm seus fatores de virulência limitados por um sistema imune ativo e pela competição com outros microrganismos que ocupam o ecossistema em que habitam, impedindo-os de causar doenças (Aleksun & Levi, 2006).

A cavidade oral apresenta cerca de 215 cm² de superfícies passíveis de serem colonizadas e podem ser compostas por mucosas ou mesmo superfícies mineralizadas dos elementos dentais. Ambas as superfícies são continuamente banhadas por fluidos, originando ambientes favoráveis para a adesão bacteriana (Collins & Davies, 1987; Socransky & Haffajee, 2005).

Considerando-se a hierarquia ecológica, os microrganismos proliferam no seu ecossistema e constituem populações, que interagem umas com as outras originando uma comunidade. Dessa forma, uma comunidade microbiana é um agrupamento de populações que interage e modifica o ecossistema do qual faz parte (Siqueira & Rôças, 2009a). As comunidades microbianas podem estar presentes tanto em condições de saúde ou doença.

Zaura *et al.* (2009) estudaram a microbiota das superfícies dentais, bochechas, língua palato duro e saliva de três indivíduos saudáveis. Observou-se que várias espécies são compartilhadas pelos indivíduos formando um núcleo de espécies que constitui a microbiota da cavidade oral quando há ausência de patologia.

As principais vias de acesso dos microrganismos até a cavidade pulpar são a cárie dental, túbulos dentinários expostos, exposição pulpar direta, procedimentos restauradores, canais laterais em dentes com comprometimento periodontal e através da corrente sanguínea, na via anacorética (Gomes, 2002).

Takehashi *et al.* (1965) demonstraram que o rompimento da esterilidade do interior do órgão dentário com a exposição da polpa dental aos contaminantes oriundos da saliva promoveu ausência de reparo tecidual por produção de pontes de dentina, causando necrose pulpar.

As respostas pulpares aos irritantes microbianos, químicos ou físicos são similares aos demais tecidos conjuntivos, sendo proporcional a intensidade, severidade e duração do estímulo (Torabinejad, 2002). Quando a inflamação

pulpar se torna aguda, eventos vasculares se desenvolvem, induzidos e amplificados por mediadores químicos liberados após a agressão tecidual. As alterações vasculares incluem: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e posterior migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (Siqueira *et al.*, 2004a). Como o tecido pulpar encontra-se circundado por paredes inextensíveis de dentina, não apresenta uma circulação colateral eficiente, ocorre o colapso das vênulas e vasos linfáticos promovido também pela acentuada pressão tecidual, evoluindo para uma necrose de liquefação (Torabinejad, 1994; Torabinejad, 2002).

O canal radicular que contém uma polpa necrótica é facilmente infectável, pois a defesa do hospedeiro não atua em seu interior de forma efetiva e passa a atuar somente em uma pequena área restrita à região apical, o que faz com que as bactérias estejam protegidas do sistema imune (Haapasalo, 1993).

O interior dos canais radiculares possui condições específicas que favorecem o crescimento de certas espécies microbianas (Möller *et al.*, 1981; Sundqvist, 1992). Estruturalmente, a população microbiana encontra-se suspensa no lúmen do canal radicular, com uma variedade imensa de tipos morfológicos consistindo em cocos, bacilos e formas filamentosas, além de serem observados também densos agregados bacterianos aderidos às paredes do canal radicular (Nair, 1987). As bactérias podem ser encontradas também penetrando os túbulos dentinários, atingindo profundidades próximas a 300 µm (Siqueira *et al.*, 2002a).

As populações microbianas raramente existem no ambiente em completo isolamento. O confinamento de uma população por fatores químicos e físicos e as ações das populações vizinhas afetam a dinâmica de desenvolvimento e o comportamento fisiológico de um grupo de microrganismos (Gharbia & Shah, 1993). Em algumas situações, os organismos comensais podem multiplicar-se, atingindo número elevado de indivíduos, tornando impossível a atuação do sistema de defesas (Sundqvist, 1992).

Para que os microrganismos superem as defesas do hospedeiro, eles devem sofrer contínuas alterações com o objetivo de se adaptarem às mudanças no meio onde se estabelecem (Ziembuhr *et al.*, 1999). A virulência dos microrganismos pode ser afetada pelas relações de sinergismo que se estabelecem entre as bactérias, quando em infecções mistas (Gomes *et al.*, 1994b).

A existência de tecido necrótico nos canais radiculares aumenta o risco potencial da ocorrência de uma infecção periapical (Bergenholtz, 1974). Möller *et al.* (1981) demonstraram a associação entre dentes com necrose pulpar e contaminação e o desenvolvimento de reações inflamatórias intensas nos tecidos periapicais. Dessa forma, o egresso de microrganismos, subprodutos de seu metabolismo e tecidos pulpares alterados de canais radiculares infectados inicia a formação e perpetuação de lesões periapicais (Torabinejad, 1994).

De acordo com Morse (1987), após a infecção se estabelecer nos tecidos pulpares, diferentes trajetos podem estar relacionados à sua evolução. A infecção pode:

- a) permanecer confinada no canal radicular sendo erradicada através de um tratamento endodôntico adequado, sem envolvimento periapical;
- b) permanecer no interior dos canais radiculares e estimular a formação de um granuloma, um cisto perirradicular ou uma osteíte condensante;
- c) deixar o ápice e temporariamente superar o sistema de defesas do organismo, formando um abscesso periapical agudo ou a exacerbação de um granuloma periapical (abscesso fênix) ou de um cisto radicular;

- d) deixar o ápice e difundir-se através dos tecidos apicais formando um abscesso, que evolui de acordo com a localização e a natureza das estruturas anatômicas circunjacentes;
- e) ocasionar agudizações periódicas, formando uma lesão crônica que apresenta via de drenagem dentro da cavidade oral (região vestibular, palatina ou lingual, sulco gengival, região de furca) ou no exterior (pele e face);
- f) disseminar-se através da circulação sangüínea, causando bacteremia (apenas bactérias), septicemia (bactérias e toxinas), ou toxemia (toxinas), dependendo da virulência dos microrganismos e da resistência do hospedeiro.

Os abscessos periapicais agudos (APA) resultam da extensão da infecção presente inicialmente no interior do sistema de canais radiculares à área perirradicular (Brook *et al.*, 1981).

Durante o processo inflamatório agudo, a dilatação arteriolar resulta em um aumento do fluxo sanguíneo no sítio da injúria. Este processo ocasiona uma permeabilidade vascular aumentada, proporcionando a passagem de um fluido rico em proteínas para o meio extracelular, contendo também neutrófilos (Henson & Johnston, 1987). Jensen & Bainton (1973) relataram que 7 a 15 minutos após a fagocitose de microrganismos, o pH de neutrófilos e macrófagos atingiu valores de 3.5 a 4.5. A hidrólise ácida é a responsável pela morte dos microrganismos (Mayer *et al.*, 1989). Concomitantemente, os leucócitos polimorfonucleares que exibem injúrias celulares ou estão inativos liberam o seu conteúdo ácido no ambiente extracelular (Nair, 2007). O egresso contínuo de antígenos promove uma diversidade intensa de reações imunológicas que podem participar na desorganização e desestruturação da arquitetura tecidual (Torabinejad, 1994). Forma-se assim um líquido amarelo-esverdeado constituído por exsudato, leucócitos, restos celulares, microrganismos e debris teciduais chamado de pus (Brook *et al.*, 1981; Dorland, 1994).

A lesão aguda pode então se intensificar e se disseminar através do osso, pode se difundir para o exterior através da formação de um trajeto fistuloso, ou pode tornar-se crônica (Nair, 2007).

Considerando que a patogênese das alterações pulpares e periapicais está relacionada diretamente com a presença de microrganismos, torna-se importante descrever os métodos empregados para caracterizar a microbiota desses dois ecossistemas.

2.4 MÉTODOS DE ESTUDO DA INFECÇÃO ENDODÔNTICA

2.4.1 Método de Cultura Microbiana

O método de cultura microbiana é considerado o “padrão ouro” para a avaliação microbiológica das infecções odontogênicas agudas (Dahlén, 2002). O cultivo de microrganismos em laboratório a partir de amostras clínicas apresenta vantagens: permite o crescimento de espécies variadas de forma não seletiva; fornece cepas para a realização de testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos; e permite o estudo da fisiologia e da patogenicidade microbiana (Siqueira & Rôças, 2005a).

Desde 1960, pesquisadores demonstram a importância de se empregar técnicas de isolamento de microrganismos anaeróbios. Em seu estudo, Shovelton (1960) constatou que as coletas microbianas que se mostravam negativas para a cultura de microrganismos aeróbios tinham resultados positivos quando eram utilizados métodos laboratoriais mais avançados. Sabiston & Gold (1974) foram categóricos ao afirmar que era necessário estudar as infecções orais empregando-

se técnicas de anaerobiose e realizar a coleta das amostras com extremo cuidado. Em anos anteriores, pesquisadores como Brown e Rudolph (1957) haviam observado, em microscopia de campo escuro que esfregaços de fluido proveniente de canais radiculares continham formas espiraladas e fusiformes, ainda não passíveis de cultivo. Em 1976, Sabiston *et al.* alertaram que os métodos de cultivo disponíveis na época eram deficientes, sugerindo que os organismos presentes nas amostras poderiam não ser os patógenos mais importantes no desenvolvimento da doença pulpar.

Nesse mesmo período, surgiram técnicas que aprimoraram as ferramentas para diagnóstico das infecções anaeróbias, tais como elaboração de novos meios de cultura (Syed & Loesche, 1973) e emprego de meios pré-reduzidos (Ellner *et al.*, 1973), meios de transporte mais efetivos (Syed & Loesche, 1973), métodos de identificação (Starr *et al.*, 1973; Tharagonet *et al.*, 1977) e condições de armazenamento das coletas (Roseblatt & Stewart, 1975). Em 1981, Morse traçou um panorama da Microbiologia Endodôntica praticada nos anos 70, predizendo que os próximos desafios neste campo seriam, inicialmente, o estabelecimento de uma associação entre determinadas espécies e o desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais e, posteriormente, a simplificação das metodologias para o cultivo de microrganismos fastidiosos.

Em 1976, Sundqvist utilizou métodos de cultura em anaerobiose, com o objetivo de avaliar a microbiota de 32 dentes traumatizados e que apresentavam necrose pulpar e coroas íntegras. A seleção criteriosa dos pacientes permitiu a exclusão de fatores que pudessem gerar contaminações nas amostras. Microrganismos anaeróbios estritos foram isolados em 90% dos casos, valor nunca antes obtido em estudos empregando cultura de bactérias fastidiosas.

De acordo com Summanen *et al.* (1993), o processamento laboratorial de amostras clínicas que incluem microrganismos anaeróbios envolve diversas etapas. A análise macroscópica permite a identificação de odor, presença de

tecido necrótico, grânulos, pus ou sangue. A amostra é preparada e inoculada em meios de cultura para microrganismos anaeróbicos, tais como Brucella Agar, Meio Tioglicolato, Columbia Agar, Fastidious Anaerobe Agar. Os procedimentos de incubação podem ser realizados em cabines de anaerobiose ou mesmo em jarros de anaerobiose. Após o crescimento inicial de 7 a 14 dias, realiza-se o exame primário das placas e identifica-se as colônias fenotipicamente diferentes, que serão subcultivadas. Determina-se o requerimento gasoso das colônias e quando estas estiverem em cultura pura, realizam-se testes de identificação presuntiva como a coloração de Gram. Dependendo da disponibilidade do laboratório, procedimentos de identificação são realizados através de testes bioquímicos, testes de reações enzimáticas ou cromatografia gás-liquida.

Por outro lado, os métodos de cultura podem apresentar limitações, pois existem patógenos ainda não cultivados, há possibilidade de ocorrência de contaminação durante os procedimentos de coleta e processamento, além de envolverem procedimentos dispendiosos e demorados (Walton, 1999).

2.4.2 Métodos de Identificação Molecular

As bactérias são os microrganismos que estão em maior número na cavidade oral, embora vírus, fungos e protozoários estejam presentes (Siqueira & Rôças, 2005a). Paster *et al.* (2001) relataram que cerca de 700 diferentes espécies, pertencendo a 11 filos do domínio Bacteria, foram detectadas na cavidade oral de humanos e cerca de 50% destas bactérias não foram ainda isoladas. A ausência de conhecimento a respeito de todas as características do ecossistema onde os microrganismos habitam muitas vezes impede o seu cultivo laboratorial (Ercolini, 2004).

A introdução de métodos moleculares de diagnóstico representou uma ferramenta importante para a identificação de patógenos (Song, 2005) e também para a determinação da posição taxonômica das espécies microbianas, gerando alterações de nomenclaturas e sua redistribuição nos gêneros (Siqueira & Rôças, 2005a). Por exemplo, o microrganismo previamente denominado de *Fusobacterium alocis* foi reclassificado e renomeado para *Filifactor alocis* (Jalava *et al.*, 1999). Estudos filogenéticos revelaram que os integrantes do gênero *Peptostreptococcus* apresentam grande heterogeneidade, sendo freqüentemente redirecionados para outros gêneros. Assim, a espécie *Peptostreptococcus micros* foi renomeada para *Micromonas micros*, sendo reconhecida atualmente como *Parvimonas micra* (Tindall & Euzéby, 2006). *Bacteroides forsythus* foi inicialmente descrito em 1986 no Forsyth Institute em Boston (MA, EUA) pela pesquisadora Anne Tanner, sendo posteriormente alocado em um novo gênero, conhecido como *Tannerella* spp., e recebendo denominação de *Tannerella forsythensis*. Em 2002, Sakamoto *et al.* propuseram uma adaptação desta denominação, sendo finalmente escolhida *Tannerella forsythia*.

Siqueira & Roças (2005a) relataram as vantagens das técnicas moleculares, tais como: detecção de espécies cultiváveis e de espécies difíceis de serem cultivadas; alta especificidade na detecção de espécies com fenótipos similares; detecção direta de espécies sem a necessidade de cultivo laboratorial; alta sensibilidade; maior rapidez; fornece diagnósticos rápidos, necessários principalmente em doenças ou infecções que podem causar morte ou detecção de espécies de lento crescimento; as técnicas de coleta e transporte são menos críticas quanto à manutenção da anaerobiose.

O alvo de estudo das técnicas moleculares de diagnóstico é o gene 16S rRNA presente no DNA de células bacterianas, responsável pelo armazenamento das informações genéticas que garante a síntese da subunidade 16S do RNA ribossomal (Dahllöf, 2002). Este gene apresenta um alto grau de conservação, sendo denominado por Woese (1987) de “cronômetro molecular avançado”.

Embora não se saiba ainda a taxa absoluta de alterações na sua seqüência, ele permite determinar a distância evolutiva e a relação entre as espécies microbianas (Clarridge, 2004).

A detecção de espécies associadas às infecções endodônticas baseadas na estrutura do DNA bacteriano tem sido realizada através da amplificação de regiões do gene 16S rRNA pela reação em cadeia da enzima polimerase (ou *Polymerase Chain Reaction*) e através da hibridização direta do DNA bacteriano a uma sonda de DNA. Existem métodos que permitem a quantificação de ácidos nucléicos ou ainda a caracterização de comunidades microbianas complexas. O número de novos protocolos ou mesmo variações de técnica tem aumentado e apresentam vantagens e limitações.

Em Endodontia, os resultados fornecidos pelos métodos de cultura foram confirmados e significativamente complementados pelas técnicas moleculares. Dessa maneira, ocorreu uma redefinição da composição da microbiota dos canais radiculares (Siqueira & Roças, 2005b). As técnicas de PCR expandiram a lista de patógenos suspeitos de estarem envolvidos nas patologias pulpares e periapicais através da detecção de espécies de difícil cultivo ou mesmo impossíveis de serem cultivados com as técnicas e meios de culturas. Vianna *et al.* (2006) observaram a presença de membros metanogênicos do domínio *Archea*, que são comensais em sítios favoráveis a presença de microrganismos anaeróbios como as bolsas periodontais, mas nunca antes descritas como patógenos participantes de infecções endodônticas. Siqueira & Roças (2005c) ressaltaram a importância do desenvolvimento de novas técnicas de cultivo e meios de cultura para que se possa investigar a relação desses microrganismos com outras espécies no estabelecimento da patologia pulpar e periapical, e também permitir a determinação da sua suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.

2.4.2.1 Técnica de PCR

A técnica de Reação em Cadeia pela Enzima Polimerase ou “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR) consiste na amplificação exponencial de uma seqüência específica de nucleotídeos através de processos bioquímicos *in vitro*, gerando uma quantidade de DNA passível de detecção (Mullis, 1990,1993; Song, 2005).

Para a execução da técnica, empregam-se seqüências de nucleotídeos artificialmente desenhadas (*primers*) e que correspondem à espécie alvo. Os *primers* têm a capacidade de se ligar de forma estável à fita alvo de DNA na região específica de interesse (Markham, 1993; Rychlik, 1993).

A reação de amplificação de ácidos nucléicos através de PCR é o resultado de alterações de temperaturas programadas em um ciclo repetido de forma controlada. A amostra original é amplificada durante os 5 a 6 primeiros ciclos de PCR, e nos ciclos seguintes ocorrem apenas a amplificação efetiva dos produtos que apresentam as seqüências localizadas entre os dois *primers* (Louie *et al.*, 2000; Dahllöf, 2002).

O produto da reação é observado em géis de agarose ou poliacrilamida corados com substâncias fluorescentes. A presença de uma espécie é determinada pela observação de bandas de comprimento específico (em pares de base) (Spolidorio & Spolidorio, 2005).

2.4.2.2 Técnica de *Nested-PCR*

É uma variação do PCR bastante sensível e específica, que envolve o uso de dois conjuntos de *primers* em reações distintas (Song, 2005; Siqueira & Roças, 2005a; Singh, 2006). A primeira reação de PCR emprega um conjunto de *primers* para amplificar o gene 16S rRNA dos patógenos a partir do DNA extraído de amostras clínicas (Song, 2005). O produto desta reação é submetido a uma segunda reação de PCR que utiliza um primer de uma espécie específica, permitindo o seu anelamento a uma seqüência compreendida no interior do primeiro amplicon (Singh *et al.*, 2006).

O *Nested-PCR* apresenta uma maior especificidade e sensibilidade quando comparado ao método de PCR convencional (Song, 2005). Este fato se deve ao maior número de ciclos aos quais as amostras são submetidas e também à restrição das seqüências às quais os primers da segunda reação podem se anelar (Siqueira & Roças, 2005a). Ocorre ainda a redução de inibidores de reação presentes na amostra inicial (Siqueira & Roças, 2003a).

A maior desvantagem deste método é que durante a manipulação do produto da primeira reação há possibilidade de contaminação do local de trabalho com o DNA amplificado (Siqueira & Roças, 2005a; Singh *et al.*, 2006).

2.4.2.3 Técnica da Análise do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição - *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP)

É uma técnica molecular que permite a caracterização da estrutura de comunidades microbianas e também possibilita a detecção das diferenças no material genético de cepas bacterianas de uma mesma espécie, baseada nas variações que ocorrem nas seqüências das bases que compõe o gene 16S rRNA (Marsh, 1999; Song, 2005).

De forma sucinta, inicialmente o DNA bacteriano é extraído da amostra clínica para ser submetido a uma reação de PCR. Nesta reação, são empregados *primers* específicos contendo marcadores fluorescentes em uma das extremidades (5'). O produto da PCR é purificado para a remoção de sais e excesso de *primers*. Aplicam-se enzimas de restrição, capazes de reconhecer e clivar seqüências específicas de nucleotídeos (geralmente 4 pares de bases) presentes na dupla fita de DNA, gerando fragmentos com diferentes tamanhos e composição. Os produtos resultantes da digestão enzimática são analisados através de eletroforese em géis ou em capilares em sistemas automatizados com detectores.

Os dados fornecidos pela técnica descrita por Liu *et al.* (1997) são a presença de picos em um diagrama, caracterizando a amostra pelo número de picos e diversidade no comprimento dos fragmentos gerados. A presença e as variações de comprimento dos fragmentos de DNA gerados estariam relacionadas a espécies diferentes (Dickie & FitzJohn, 2007). Dickie *et al.* (2002) e Zhou & Hogetsu (2002) introduziram recentemente modificações na técnica, onde os perfis dos picos obtidos nos fragmentos de restrição (número de bases e fluorescência gerada) são comparados a bases de dados, que contém informações de fragmentos já conhecidos. Assim, é possível identificar de forma

mais precisa as espécies que apresentavam mesmos padrões de fragmentos, ou ainda, agrupar os múltiplos padrões de fragmentos de restrição fornecidos por uma mesma espécie.

2.5 MICROBIOTA DAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS ASSOCIADAS À SINTOMATOLOGIA DOLOROSA ESPONTÂNEA

Uma vez descritas as condições necessárias para o estabelecimento da infecção endodôntica no sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais, bem como os métodos para o seu estudo, é importante a caracterização das microbiotas que as constituem e a determinação das relações entre grupos de microrganismos e os achados clínicos.

2.5.1 Microbiota do Canal Radicular em Infecções Primárias Associadas à Sintomatologia Dolorosa

2.5.1.1 Caracterização através de Cultura Microbiana

A microbiota isolada nos canais radiculares de dentes que apresentam sintomatologia dolorosa espontânea através do método de cultura microbiana é geralmente mista e constituída principalmente por espécies anaeróbias estritas (Sundqvist *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1994a; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003).

Gomes *et al.* (2004) relataram que existe uma diferença das características da composição da microbiota dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar (infecção primária) e de dentes tratados endodonticamente que apresentam insucesso (infecção secundária/persistente). Em infecções primárias, a microbiota é mista e formada por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, principalmente anaeróbios, com no máximo dez espécies diferentes por canal radicular. Já nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, os autores observaram a predominância de microrganismos anaeróbios facultativos e Gram-positivos, com uma média de uma ou duas espécies por canal radicular. Os autores sugerem que as interações entre diferentes grupos bacterianos permitem o estabelecimento de uma patologia, dificilmente encontrada quando os mesmos microrganismos estão isolados.

Jacinto *et al.* (2003) relatam que o número de espécies microbianas passíveis de cultivo e que integram a microbiota em infecções endodônticas primárias sintomáticas é superior àquele observado para casos onde não havia dor.

Os microrganismos anaeróbios estritos *Peptostreptococcus anaerobius*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Peptococcus prevotii*, *Prevotella intermedia/nigrescens* e *Gemella morbillorum*, e os facultativos *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus mitis*, *Eubacterium alactolyticum* e *Eubacterium lentum* são as espécies mais frequentemente isoladas em canais radiculares de dentes com sintomatologia dolorosa espontânea de origem endodôntica (Sundqvist *et al.*, 1989; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003).

Um dos principais grupos associados às infecções endodônticas sintomáticas são as bactérias produtoras de pigmento negro. Estes são bacilos anaeróbios Gram-negativos pigmentados que colonizam as mucosas e são microrganismos indígenas da cavidade oral. Quando cultivados em ágar,

apresentam a capacidade de produzir pigmento negro, caracterizado quimicamente como protohemina e protoporfirina (Shah & Gharbia, 1993). Espécies pertencentes ao gênero *Prevotella* podem não ser pigmentadas, tais como *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Prevotella buccae*, *Prevotella bucalis*, *Prevotella oralis* e *Prevotella oris*. Inicialmente, as espécies estavam agrupadas em um único gênero, *Bacteroides*. Shah & Collins (1988, 1990) propuseram sua divisão, baseando-se em características nutricionais, análises químicas e bioquímicas. As espécies sacarolíticas foram agrupadas no gênero *Prevotella*, enquanto que espécies assacarolíticas pertencem ao gênero *Porphyromonas*.

A **Tabela 1** resume os estudos que avaliaram a microbiota de canais radiculares associados às infecções endodônticas primárias sintomáticas, indicando a percentagem de microrganismos anaeróbios isolados e também enumera as espécies mais freqüentemente isoladas.

Tabela 1. Achados microbiológicos em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa espontânea, através do método de cultura microbiana.

| Estudo | Anaeróbios | Cocos Anaeróbios | | Bacilos Anaeróbios | | An. facultativos |
|--------------------------------|------------|---|-------------------------|---|---|---|
| | | Gram + | Gram - | Gram + | Gram - | |
| Sundqvist <i>et al.</i> (1989) | 91,4% | <i>P. anaerobius</i> * <i>P. micros</i> * | - | <i>Actinomyces</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. | <i>F. nucleatum</i> * <i>B. buccae</i> <i>B. denticola</i> <i>B. endodontalis</i> <i>B. gingivalis</i> <i>B. gracilis</i> <i>B. intermedius</i> * <i>B. loescheii</i> <i>W. recta</i> | <i>Streptococcus</i> spp. <i>E. brachy</i> <i>E. alactolyticum</i> * <i>E. lentum</i> * <i>E. timidum</i> |
| Jacinto <i>et al.</i> (2003) | 74,77% | <i>P. prevotii</i> * <i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i> * <i>G. morbillorum</i> * | <i>Veillonella</i> spp. | <i>A. odontolyticus</i> <i>B. adolescentis</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>C. acetobutylicum</i> <i>A. meyeri</i> <i>P. acnes</i> | <i>F. necrophorum</i> * <i>F. nucleatum</i> * <i>P. int/nigrescens</i> * <i>P. corporis</i> <i>P. oralis</i> <i>C. gracilis</i> <i>B. fragilis</i> <i>P. loescheii</i> <i>P. melaninogenica</i> | <i>S. sanguis</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. mitis</i> <i>E. lenta</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. anginosus</i> <i>E. limosum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>S. saccharolyticus</i> |
| Sousa <i>et al.</i> (2003) | 64,10% | <i>G. morbillorum</i> * <i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i> * <i>P. prevotii</i> * <i>Peptostrept.</i> spp. | <i>Veillonella</i> spp. | <i>C. subterminale</i> | <i>B. gracilis</i> <i>F. necrophorum</i> * <i>F. nucleatum</i> <i>P. corporis</i> <i>P. int./nigrescens</i> <i>P. loescheii</i> | <i>E. lentum</i> <i>G. haemolysans</i> <i>L. acidophilus</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> * <i>S. epidermidis</i> <i>S. mitis</i> * <i>S. oralis</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. sanguis</i> |

* Espécies mais freqüentemente isoladas.

Haapasalo *et al.* (1986) estudaram a influência de espécies produtoras de pigmento negro sobre o surgimento de sintomatologia em canais radiculares com necrose pulpar. Para estes autores, não houve uma relação direta entre a presença de bactérias produtoras de pigmento negro (BPPN) e sintomatologia dolorosa, pois mesmo na sua presença observou-se ausência de sintomatologia. No entanto, quando as espécies *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis* eram isolados a possibilidade de desenvolvimento de sintomatologia foi aumentada.

Yoshida *et al.* (1987) estudaram a correlação entre a presença de certos microrganismos e sinais e sintomas de origem endodôntica em dentes com necrose pulpar e lesões periapicais, em situações clínicas distintas. No grupo composto por dentes com dor espontânea, dor à percussão e exsudação foram isolados predominantemente anaeróbios estritos (79%) pertencentes aos gêneros *Eubacterium*, *Bacteroides* e *Peptostreptococcus*. Quando os dentes apresentavam-se somente com dor à percussão e sem sintomatologia espontânea os anaeróbios *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Bacteroides* e os facultativos *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus* e enterobactérias encontravam-se associados nos canais radiculares. Microrganismos anaeróbios facultativos pertencentes aos gêneros *Streptococcus* e enterobactérias foram isolados com mais frequência em casos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical, sem sintomatologia dolorosa. Concluiu-se que a constituição da microbiota dos canais radiculares influencia no desenvolvimento ou não de sintomatologia clínica.

Sundqvist *et al.* (1989) relacionaram a presença de bactérias produtoras de pigmentos negros a canais radiculares de dentes com abscessos periapicais. Quando BPPN foram isoladas, observou-se um aumento na incidência de anaeróbios estritos (91,4%), ao passo que em canais onde não foram isolados,

apenas 87,2% da microbiota era constituída por microrganismos anaeróbios estritos.

Hashioka *et al.* (1992), ao estudarem a relação entre os achados clínicos e a composição da microbiota de canais radiculares infectados, observaram que o número de colônias em casos que apresentavam sintomatologia dolorosa espontânea foi superior àqueles casos onde não havia sintomatologia. Uma correlação positiva foi estabelecida entre a presença de dor à percussão e as espécies *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *Bacteroides* spp., tornando estes microrganismos patógenos suspeitos de causarem alterações periapicais. O odor desagradável ao acessar o sistema de canais radiculares foi observado principalmente em casos onde *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp. e *Bacteroides* spp. foram encontrados.

Para Gomes *et al.* (1994a), a presença de dor espontânea estava associada com as espécies *Prevotella* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica* e *Peptostreptococcus* spp. *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus* spp. e *Parvimonas micra* estiveram associadas à edema. Correlações positivas foram observadas também entre presença de fístula e *Eubacterium lentum*. Quando havia exsudato purulento no canal radicular, isolaram-se os microrganismos *Fusobacterium* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella buccae* e *Prevotella loescheii*.

Em 1994b, Gomes *et al.* sugeriram que o desenvolvimento da patologia endodôntica é dependente de associações entre as espécies. Ao avaliarem uma extensa série de casos através do método de cultura bacteriana, os autores relatam o isolamento de até 11 diferentes espécies nos canais radiculares. Associações positivas foram observadas entre *Peptostreptococcus* spp./*Prevotella* spp., *P. micros*/*Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp./*P. melaninogenica*, *Prevotella* spp./*Eubacterium* spp., *P. micros*/*P. melaninogenica*, dentre outras.

Bae *et al.* (1997) diferenciaram as espécies *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, através de SDS-Page, em 56 cepas identificadas inicialmente como *Prevotella intermedia*, isoladas de canais radiculares e abscessos periapicais. Os autores constataram que a composição protéica celular das duas espécies diferem na presença de uma proteína com peso molecular de 18,6 kDa para *P. nigrescens*. Assim, foi possível estabelecer que cerca de 73,2% das cepas eram *P. nigrescens*, enquanto que apenas 26,8% eram *P. intermedia*.

Dougherty *et al.* (1998) verificaram a presença de bactérias produtoras de pigmento negro em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesões periapicais. Observaram que *Prevotella nigrescens* foi a BPPN predominantemente isolada nas regiões coronárias e apicais dos canais radiculares. Isolou-se em menores quantidades *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica* e *Porphyromonas gingivalis*. Os autores não conseguiram estabelecer nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a presença de BPPN e intensidade de dor, presença de pus e edema. Ao empregar a metodologia de SDS-Page para diferenciar bactérias da mesma espécie obtidas a partir da mesma amostra, os autores observaram similaridade na expressão protéica sugerindo serem originadas da mesma cepa.

Baumgartner *et al.* (1999) relataram a presença de BPPN em 55% das amostras de dentes que apresentavam sintomatologia dolorosa, sendo *P. nigrescens* (50%), *P. intermedia* (36%), *P. gingivalis* (9%) e *P. melaninogenica* (5%) as mais freqüentemente isoladas. No entanto, não foi possível estabelecer correlações positivas entre a sua presença e sinais e sintomas como dor, tamanho de lesão periapical, presença de fístula e exsudato purulento.

Lana *et al.* (2001) constataram que uma associação de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas e microaerófilas, além de fungos, são encontradas em canais radiculares e pertencem aos gêneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*,

Candida e *Saccharomyces*. Correlações positivas foram observadas para a presença simultânea de espécies dos gêneros *Clostridium* e *Prevotella*, além de *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*.

Peters *et al.* (2002) empregaram testes estatísticos de correlação e observaram 81 possíveis associações estatisticamente significativas entre microrganismos. Para os autores, os microrganismos não estão distribuídos nos canais radiculares de maneira aleatória, e destacam a importância do conhecimento das interações microbianas para o estabelecimento da patologia endodôntica. Assim, constataram que em casos de necrose pulpar onde não se encontra associada sintomatologia dolorosa, podem ser isolados também altos índices de microrganismos anaeróbios estritos (87%).

Jacinto *et al.* (2003) estabeleceram diferenças entre a microbiota de dentes com necrose pulpar quando havia ou não presença de sintomatologia dolorosa. Constataram que dentes assintomáticos abrigavam um menor número de microrganismos cultiváveis quando comparados aos dentes sintomáticos, com uma média de nove espécies por canal radicular. A presença de microrganismos anaeróbios estritos foi mais marcante em casos associados com sintomatologia dolorosa (72,4%), sendo freqüentemente isolados *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia/nigrescens*. Bactérias Gram-negativas constituíram aproximadamente 39% do total de isolados, e sua presença estava associada à dor espontânea, episódios de dor prévia, dor à palpação e edema.

Sousa *et al.* (2003) estudaram a microbiota de dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa associados a abscessos periapicais. Os autores observaram um total de 117 isolados, indicando uma média de 3,9 espécies por canal radicular. Desses, 75 microrganismos eram anaeróbios e 42 eram facultativos. Um predomínio de espécies Gram-positivas foi observado. As espécies mais freqüentemente isoladas foram os fastidiosos *P. prevotii*, *P. micros*,

F. necrophorum, *P. intermedia/nigrescens*. Menos encontrados, mas também presentes estiveram os facultativos *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis* e *Gemella haemolysans*.

Embora isolados mais freqüentemente em infecções endodônticas secundárias/persistentes, bactérias do gênero *Enterococcus* também são isoladas em infecções endodônticas primárias. Lana *et al.* (2001) demonstraram a sua presença em apenas 1 caso de necrose pulpar sem sintomatologia dolorosa, associada a presença de uma câmara pulpar manipulada anteriormente à realização da coleta para o referido estudo. Gomes *et al.* (2004) relataram também uma baixa incidência de *Enterococcus faecalis* em casos de infecção primária (2 casos em 41 amostras) e a sua presença estava associada com o desenvolvimento de edema periapical.

Foschi *et al.* (2005) observaram este microrganismo em 12,8% dos casos de dentes que apresentavam sintomatologia dolorosa e em 60% dos casos em que não demonstravam sintomas clínicos de origem endodôntica, estabelecendo uma correlação positiva com casos de periodontite apical crônica.

2.5.1.2 Caracterização através de Métodos Moleculares

O uso de métodos moleculares de diagnóstico permitiu a confirmação da presença de espécies isoladas através de cultura microbiana e a detecção de espécies fastidiosas, de difícil cultivo ou ainda não-cultivadas em amostras de infecções endodônticas primárias associadas à sintomatologia dolorosa, obtidas a partir de coletas de canais radiculares (Siqueira & Rôças, 2009b).

A **Tabela 2** demonstra de forma esquemática os métodos moleculares de diagnóstico empregados e os principais resultados obtidos no estudo da microbiota de canais radiculares associadas à sintomatologia dolorosa.

Tabela 2. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de canais radiculares em dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa.

| Estudo | Método | Espécies (n ₊ /n _{total}) |
|--------------------------------|------------------------|--|
| Oliveira <i>et al.</i> (2000) | PCR Espécie-Específico | <i>Porphyromonas endodontalis</i> (4/6) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2001a) | PCR Espécie-Específico | <i>Treponema denticola</i> (8/15) |
| Rôças <i>et al.</i> (2002a) | PCR Espécie-Específico | <i>A. actinomycetemcomitans</i> (0/13) <i>B. forsythus</i> (7/13) <i>C. rectus</i> (1/13) <i>F. nucleatum</i> (0/13) <i>M. micros</i> (2/13) <i>P. endodontalis</i> (7/13) <i>P. gingivalis</i> (7/13) <i>P. intermedia</i> (0/13) <i>P. nigrescens</i> (1/13) <i>S. anginosus</i> (group) (1/13) <i>T. denticola</i> (7/13) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2002b) | PCR Espécie-Específico | <i>Bacteroides forsythus</i> (9/21) <i>Fusobacterium nucleatum</i> (0/13) <i>Streptococcus anginosus</i> (0/10) <i>Actinomyces israelii</i> (0/4) <i>A. actinomycetemcomitans</i> (0/18) Fungo (primer universal) (0/2) |

Tabela 2. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de canais radiculares em dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa (Continuação).

| Estudo | Método | Espécies (n ₊ /n _{total}) |
|--------------------------------|------------------------|---|
| Rôças <i>et al.</i> (2003a) | Nested-PCR | <i>T. denticola</i> (8/10) <i>T. socranskii</i> (4/10) <i>T. vincentii</i> (1/10) <i>T. pectinovorum</i> (0/10) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2003b) | PCR Espécie-Específico | <i>P. propionicus</i> (5/10) <i>A. radidentis</i> (1/10) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2003c) | Nested-PCR | <i>B. forsythus</i> (3/6) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2003d) | PCR Espécie-Específico | <i>P. micros</i> (2/8) |
| Siqueira & Rôças (2003e) | Nested-PCR | <i>T. amylovorum</i> (5/10) <i>T. lecithinolyticum</i> (1/10) <i>T. maltophilum</i> (1/10) <i>T. medium</i> (1/10) |
| Siqueira & Rôças (2003f) | PCR Espécie-Específico | <i>Treponema socranskii</i> (4/7) |
| Siqueira & Rôças (2003g) | Nested-PCR | <i>Filifactor alocis</i> (3/10) |
| Siqueira & Rôças (2004b) | Nested-PCR | <i>Centipeda periodontii</i> (1/7) |
| Foschi <i>et al.</i> (2005) | PCR Espécie-Específico | <i>T. denticola</i> (14/47) <i>P. gingivalis</i> (5/47) <i>P. intermedia</i> (5/47) <i>T. forsythensis</i> (3/47) <i>E. faecalis</i> (6/47) |

Tabela 2. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de canais radiculares em dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa (Continuação).

| Estudo | Método | Espécies (n ₊ /n _{total}) |
|-----------------------------|------------------------|--|
| Rôças <i>et al.</i> (2005a) | Nested/Semi-Nested PCR | <i>Dialister invisus</i> (6/10) <i>Olsenella uli</i> (4/10) <i>Sinergistes</i> oral clone BA121 (2/10) <i>Sinergistes</i> oral clone E33_3 (2/10) <i>Granulicatella adiascens</i> (1/10) <i>Atopobium parvulum</i> (2/10) <i>Synergistes</i> oral clones BH017/D084 (1/10) <i>Synergistes</i> oral clone W090 (2/10) <i>Desulfobulbus</i> oral clone R004 (1/10) TM7 oral clone I025 (0/10) <i>Actinobaculum</i> oral clone EL030 (0/10) <i>Prevotella pallens</i> (0/10) |
| Rôças <i>et al.</i> (2005b) | PCR Espécie-Específico | <i>Treponema parvum</i> (2/10) <i>Treponema putidum</i> (1/10) |

Tabela 2. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de canais radiculares em dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa (Continuação).

| Estudo | Método | Espécies (n ₊ /n _{total}) |
|--------------------------------|----------------------------------|--|
| Gomes <i>et al.</i> (2006a) | Nested-PCR | <i>Filifactor alocis</i> (22/48) <i>Treponema denticola</i> (19/48) <i>Tannerella forsythia</i> (11/48) |
| Roças <i>et al.</i> (2006b) | Nested PCR | <i>Veillonella parvula</i> (1/10) <i>Eikenella corrodens</i> (1/10) |
| Siqueira & Rôças (2006a) | PCR Espécie-Específico | <i>Catonella morbi</i> (3/10) <i>Granulicatella adiascens</i> (1/10) |
| Gomes <i>et al.</i> (2007) | Nested-PCR | <i>Treponema denticola</i> (9/42) <i>Tannerella forsythia</i> (15/42) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (18/42) |
| Siqueira & Rôças (2007b) | Semi-Nested PCR grupo-específico | Filotipos de <i>Synergistes</i> (6/29) |
| Gomes <i>et al.</i> (2008) | Nested-PCR | <i>Gemella morbillorum</i> (40/49) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2008a) | Nested PCR | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| Ozbek <i>et al.</i> (2009) | Real-Time PCR | <i>Treponema denticola</i> (19/30) |
| Rôças & Siqueira (2009) | Nested-PCR | <i>Bacteroidetes</i> clone X083 (6/10) <i>Prevotella baroniae</i> (6/10) <i>Prevotella multisaccharivorax</i> (6/10) |

Siqueira *et al.* (2004c) utilizaram o método da eletroforese em gel com gradiente de desnaturação para estudar a estrutura de comunidades microbianas em infecções endodônticas primárias. Os resultados demonstraram uma média de 12,1 espécies microbianas diferentes em canais radiculares de dentes que apresentavam dor (variando de 2 a 29 espécies), um número superior ao obtido em canais de dentes assintomáticos (média de 6,7 espécies). A maioria das espécies foi detectada em apenas uma amostra, sugerindo uma diversidade microbiana bastante acentuada entre os indivíduos. Após o seqüenciamento gênico das bandas obtidas, observou-se que as espécies mais freqüentemente encontradas pertenciam aos gêneros *Campylobacter* spp., *Fusobacterium* spp., *Acinetobacter* spp, e à família *Enterobacteriaceae*.

A análise de clones e seqüenciamento gênico permitem a detecção adicional de microrganismos de difícil cultivo ou de filotipos ainda não-cultivados, através da inserção de fragmentos de DNA presentes na amostra clínica em vetores (Lodish *et al.*, 2007). Jacinto *et al.* (2007) estudaram a microbiota de amostras de canais radiculares associados a abscessos periapicais agudos através da técnica de análise de clones e seqüenciamento do gene 16S rRNA. Quarenta e oito espécies diferentes foram detectadas, distribuídas em grupos de 7 a 13. Apenas *Olsenella uli* esteve presente em todos os casos. Taxa como *Tannerella forsythia*, *Shuttleworthia satelles* e *Filifactor alocis* foram detectadas em apenas uma amostra. Os autores concluíram que a microbiota associada a infecções endodônticas primárias sintomáticas é formada por uma diversidade ampla de espécies.

Sassone *et al.* (2008) constataram que carga microbiana em canais radiculares com infecções primárias sintomáticas é mais complexa que a observada em infecções assintomáticas, tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo. Utilizando-se o método de hibridização DNA-DNA, observaram que o número médio de espécies em infecções sintomáticas foi 26, com aproximadamente 86×10^5 células. Entretanto, uma média de 20 microrganismos

e 29×10^5 células foram detectadas em infecções assintomáticas. As espécies *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vincentii*, *Veillonella parvula*, *Treponema socranskii*, *Enterococcus faecalis* e *Campylobacter gracilis* foram frequentemente detectadas em casos sintomáticos enquanto que *F. nucleatum* ssp. *vincentii*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum*, *E. faecalis*, *Eubacterium saburreum* e *Neisseria mucosa* foram detectadas em casos sem sintomatologia dolorosa.

Utilizando a técnica da análise do polimorfismo do comprimento do fragmento terminal de restrição, Saito *et al.* (2009) observaram um maior número de espécies em infecções endodônticas sintomáticas do que em assintomáticas. Demonstrou-se também que a estrutura das comunidades microbianas em infecções endodônticas primárias são complexas. Há uma grande variabilidade na composição das comunidades microbianas quando diferentes indivíduos são comparados, e nenhuma das espécies foi detectada em todas as amostras. A presença ou ausência de grupos de espécies não foi associada ao desenvolvimento de sinais ou sintomas específicos.

2.5.2 Microbiota do Abscesso Periapical Agudo

2.5.2.1 Caracterização através de Cultura Microbiana

Aderholt *et al.* (1981) relatam que devido às dificuldades de cultivo, a presença de microrganismos anaeróbios em amostras de abscessos periapicais foi subestimada em estudos de anos anteriores. Considerando a avaliação de casos do mesmo hospital, os autores relataram que entre os anos de 1977 e 1978, 29% das amostras eram negativas para crescimento microbiano ou demonstraram

altas taxas de isolamento de microrganismos facultativos, tais como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Brook *et al.* (1981) estudaram a composição da microbiota de abscessos periapicais em crianças. Em 67% dos casos, foram isolados apenas microrganismos anaeróbios estritos, enquanto que em 33% eles estavam em associação com microrganismos anaeróbios facultativos, com média de 4,4 microrganismos por amostra. Foi observada em 58% dos casos a associação positiva entre a presença de *Bacteroides* spp. e *Prevotella* spp.

Von Konow *et al.* (1981) relataram que a microbiota de abscessos periapicais agudos é complexa, com um predomínio de bacilos anaeróbios Gram-negativos e cocos anaeróbios Gram-positivos. As espécies mais freqüentemente isoladas foram *Bacteroides ruminicola* e *Fusobacterium nucleatum*, além de *Streptococcus intermedius* e bacilos gram-positivos não formadores de esporos. Tal microbiota sugere uma origem endógena da infecção, pois essas espécies são encontradas na cavidade oral de indivíduos saudáveis. Os autores salientaram que para obter o isolamento dos microrganismos anaeróbios torna-se necessário o emprego de técnicas de coleta, transporte e processamento adequadas.

Oguntebi *et al.* (1982) relatam que a composição microbiana de amostras de abscessos periapicais agudos é específica, com número reduzido de espécies. Em 20% dos casos, isolou-se apenas microrganismos facultativos, enquanto que infecções mistas foram observadas em 70% das amostras. O par *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mitis* foi encontrado em 60% das amostras.

Sklavounos *et al.* (1986), ao caracterizar a microbiota de abscessos periapicais de origem endodôntica, observaram uma maior severidade nos quadros clínicos quando as infecções eram formadas por microrganismos anaeróbios estritos e facultativos. Os autores sugerem que em infecções mistas,

os microrganismos anaeróbios facultativos favorecem a infecção, pois utilizam o oxigênio, preparando o ecossistema para a instalação dos anaeróbios estritos.

Brook *et al.* (1996) estudaram a composição microbiana de abscessos periapicais agudos de origem endodôntica e das infecções sinusais a eles associadas. Os autores observaram uma concordância entre os achados para os dois sítios relacionados, entretanto, algumas espécies estavam presentes em apenas um ecossistema. Para os abscessos, o número de microrganismos isolados variou de 2 a 5, e observou-se um predomínio de anaeróbios estritos, pertencentes aos gêneros *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., e *Fusobacterium* spp.

Khemaleelakul *et al.* (2002) relataram que há um predomínio de microrganismos anaeróbios estritos em abscessos periapicais de origem endodôntica e celulites. O número médio de espécies isoladas foi 7,5, com variação entre 3 e 13. A incidência de microrganismos pertencentes aos gêneros *Prevotella* e *Peptostreptococcus* foi superior quando comparada às demais espécies.

Riggio *et al.* (2007) estudaram casos de infecções odontogênicas severas agudas. A microbiota das amostras era constituída por cocos anaeróbios Gram-positivos e bacilos anaeróbios Gram-negativos. Uma variação de 2.2 a 6.1 microrganismos foram isolados por amostra, sendo pertencentes às espécies *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Anaerococcus prevotti*, e grupo dos *Streptococcus anginosus*, além de *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, e *Fusobacterium nucleatum*.

A **Tabela 3** resume os estudos que avaliaram a microbiota de abscessos periapicais agudos, indicando a percentagem de microrganismos anaeróbios isolados e também enumera as espécies mais freqüentemente isoladas.

Tabela 3. Achados microbiológicos em abscessos periapicais agudos, através do método de cultura microbiana.

| Estudo | Anaeróbios | Cocos Anaeróbios | | Bacilos Anaeróbios | | An. facultativos |
|--------------------------------|------------|---|--|---|---|--|
| | | Gram + | Gram - | Gram + | Gram - | |
| Sabiston <i>et al.</i> (1976) | 69% | <i>P. micros</i> * <i>P. anaerobius</i> * <i>S. intermedius</i> <i>S. morbillorum</i> | <i>V. parvula</i> <i>V. alcalescens</i> | <i>Actinomyces</i> spp.* <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Eubacterium</i> spp. | <i>B. intermedia</i> <i>B. melaninogenicus</i> <i>B. oralis</i> <i>B. ruminicola</i> <i>F. nucleatum</i> * | <i>Streptococcus</i> spp.* <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>Lactobacillus</i> spp. |
| Aderholt <i>et al.</i> (1981) | 74% | <i>S. intermedius</i> <i>P. anaerobius</i> * <i>P. prevotii</i> <i>P. magnus</i> | <i>V. alcalescens</i> | <i>E. lentum</i> | <i>B. melaninogenicus</i> * <i>B. asaccharolyticus</i> <i>F. nucleatum</i> * <i>F. varium</i> | <i>Streptococcus</i> spp.* |
| Brook <i>et al.</i> (1981) | 90% | <i>P. constellatus</i> <i>P. intermedius</i> <i>P. micros</i> <i>Streptococcus</i> spp.* | <i>V. parvula</i> | <i>Actinomyces</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. | <i>B. asaccharolyticus</i> <i>B. melaninogenicus</i> * <i>B. oralis</i> <i>B. corrodens</i> <i>Porphyromonas</i> spp. <i>F. nucleatum</i> <i>Fusobacterium</i> spp. | <i>Streptococcus</i> spp. <i>S. salivarius</i> |
| Von Konow <i>et al.</i> (1981) | - | <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i> | <i>V. parvula</i> | <i>L. plantarum</i> <i>E. lentum</i> | <i>B. ruminicola</i> <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp. <i>B. melaninogenicus</i> <i>B. distasonis</i> <i>B. disiens</i> | <i>S. milleri</i> <i>C. xerosis</i> <i>S. faecalis</i> <i>Haemophilus</i> spp. |
| Oguntebi <i>et al.</i> (1982) | 60% | <i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i> | - | <i>A. viscosus</i> | <i>B. intermedius</i> <i>F. nucleatum</i> * | <i>S. mitis</i> * <i>S. faecalis</i> |

* Espécies mais freqüentemente isoladas.

Tabela 3. Achados microbiológicos em abscessos periapicais agudos, através do método de cultura microbiana.

| Estudo | Anaeróbios | Cocos Anaeróbios | | Bacilos Anaeróbios | | An. facultativos |
|---------------------------------|------------|--|-------------------|---|---|--|
| | | Gram + | Gram - | Gram + | Gram - | |
| Sklavounos <i>et al.</i> (1986) | 32,95% | <i>Peptostreptococcus</i> spp.* <i>P. productus</i> <i>P. anaerobius</i> <i>P. intermedius</i> <i>P. parvulus</i> <i>Peptococcus</i> spp. <i>P. constellatus</i> <i>P. prevotii</i> | <i>V. parvula</i> | <i>C. bifermentans</i> <i>A. eriksonii</i> <i>E. limosum</i> <i>P. acnes</i> | <i>Bacteroides</i> spp.* <i>B. corrodens</i> <i>B. fragilis</i> <i>B. melaninogenicus</i> <i>B. ochraceus</i> <i>B. oralis</i> | <i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. epidermidis</i> * <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. |
| Lewis <i>et al.</i> (1986) | 74% | <i>Peptostreptococcus</i> spp.* <i>Peptococcus</i> spp.* <i>S. intermedius</i> <i>S. constellatus</i> | <i>V. parvula</i> | <i>P. acnes</i> <i>E. lentum</i> | <i>B. oralis</i> * <i>B. gingivalis</i> * <i>B. melaninogenicus</i> * <i>B. intermedius</i> <i>B. ruminicola</i> <i>B. distasonis</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>B. capillosus</i> <i>B. uniformis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>F. mortiferum</i> | <i>S. milleri</i> * <i>S. mitior</i> <i>S. mutans</i> <i>S. sanguis</i> . <i>L. salivarius</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. naeslundii</i> <i>A. meyeri</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>C. ochracea</i> <i>E. corrodens</i> |
| Brook <i>et al.</i> (1991) | 70% | <i>Peptostreptococcus</i> spp.* <i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i> <i>P. prevotii</i> | <i>V. parvula</i> | <i>Eubacterium</i> spp. | <i>B. oralis</i> <i>B. gingivalis</i> <i>B. melaninogenicus</i> <i>B. intermedius</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>F. nucleatum</i> <i>Fusobacterium</i> spp. | <i>Streptococcus</i> spp. |

* Espécies mais freqüentemente isoladas.

Tabela 3. Achados microbiológicos em abscessos periapicais agudos, através do método de cultura microbiana.

| Estudo | Anaeróbios | Cocos Anaeróbios | | Bacilos Anaeróbios | | An. facultativos |
|------------------------------------|------------|--|-------------------|--|---|--|
| | | Gram + | Gram - | Gram + | Gram - | |
| Brook <i>et al.</i> (1996) | - | <i>P. micros</i> <i>P. anaerobius</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp. | <i>V. parvula</i> | | <i>F. nucleatum</i> * <i>P. int./nigrescens</i> * <i>P. gingivalis</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. oralis</i> | <i>S. milleri</i> <i>S. sanguis</i> |
| Khemaleelakul <i>et al.</i> (2002) | 62,9% | <i>P. micros</i> <i>P. asaccharolyticus</i> <i>P. prevotii</i> <i>P. acnes</i> <i>G. morbillorum</i> * <i>S. intermedius</i> <i>S. costellatus</i> | <i>V. parvula</i> | <i>C. hastiforme</i> <i>C. hystoliticum</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. subterminale</i> <i>E. lentum</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. naeslundii</i> | <i>B. fragilis</i> <i>B. vulgatus</i> <i>F. mortiferum</i> <i>F. nucleatum</i> <i>F. necrophorum</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. asaccharolyticus</i> <i>P. intermedia</i> * <i>P. melaninogenica</i> * <i>P. buccae</i> * <i>P. oralis</i> <i>P. loescheii</i> | <i>C. haemolyticum</i> * <i>C. xerosis</i> * <i>C. bovis</i> <i>C. striatum</i> <i>C. propinquum</i> <i>C. diptheriae</i> <i>E. corrodens</i> <i>L. ramosus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. casei</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> * <i>S. epidermidis</i> * <i>S. oralis</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i> |
| Riggio <i>et al.</i> (2007) | - | <i>Streptococcus</i> spp. <i>S. costellatus</i> | - | - | <i>F. nucleatum</i> <i>P. buccae</i> <i>P. denticola</i> <i>P. loescheii</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. interm/nigres.</i> | <i>S. anginosus</i> <i>S. parasanguis</i> <i>S. acidominus</i> <i>S. intermedius</i> |

* Espécies mais freqüentemente isoladas.

2.5.2.2 Caracterização através de Métodos Moleculares

Sakamoto *et al.* (2006) investigaram a microbiota de abscessos periapicais agudos e revelaram que aproximadamente 40% das espécies associadas ainda não são passíveis de cultivo e correspondem a 30% da carga microbiana dessas amostras. A **Tabela 4** apresenta estudos que avaliaram a composição da microbiota de abscessos periapicais agudos, as metodologias empregadas e os resultados obtidos.

Tabela 4. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de abscessos periapicais agudos.

| Estudo | Método | Espécies (n./n _{total}) |
|--------------------------------|------------------------|---|
| Siqueira <i>et al.</i> (2001b) | PCR Espécie-Específico | <i>Porphyromonas endodontalis</i> (7/10) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (4/10) <i>Prevotella intermedia</i> (1/10) <i>Prevotella nigrescens</i> (0/10) <i>Treponema denticola</i> (5/10) <i>A. actinomycetemcomitans</i> (0/10) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2001c) | PCR Espécie-Específico | <i>Treponema denticola</i> (5/10) |
| Rôças <i>et al.</i> (2002b) | PCR Espécie-Específico | <i>Dialister pneumosintes</i> (12/18) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2002b) | PCR Espécie-Específico | <i>Bacteroides forsythus</i> (1/14) <i>Fusobacterium nucleatum</i> (2/14) <i>Streptococcus anginosus</i> (2/12) <i>Actinomyces israelii</i> (0/19) <i>A. actinomycetemcomitans</i> (0/14) Fungo (primer universal) (0/25) |

Tabela 4. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de abscessos periapicais agudos (continuação).

| Estudo | Método | Espécies (n ₊ /n _{total}) |
|--------------------------------|------------------------|---|
| Siqueira <i>et al.</i> (2003b) | PCR Espécie-Específico | <i>P. propionicus</i> (7/19) <i>A. radicidentis</i> (0/19) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2003c) | Nested-PCR | <i>B. forsythus</i> (9/18) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2003d) | PCR Espécie-Específico | <i>P. micros</i> (6/20) |
| Siqueira & Rôças (2003f) | PCR Espécie-Específico | <i>Treponema socranskii</i> (5/20) |
| Siqueira & Rôças (2003g) | Nested-PCR | <i>Filifactor alocis</i> (8/19) |
| Siqueira & Rôças (2004b) | Nested-PCR | <i>Centipeda periodontii</i> (3/20) |
| Siqueira & Rôças (2004d) | Nested-PCR | <i>T. amylovorum</i> (3/19) <i>T. denticola</i> (15/19) <i>T. lecithinolyticum</i> (0/19) <i>T. maltophilum</i> (0/19) <i>T. medium</i> (1/19) <i>T. pectinovorum</i> (4/19) <i>T. socranskii</i> (9/19) <i>T. vincentii</i> (0/19) |
| Rôças <i>et al.</i> (2005a) | Nested/Semi-Nested PCR | <i>Dialister invisus</i> (10/19) <i>Olsenella uli</i> (1/19) <i>Sinergistes</i> oral clone BA121 (1/19) <i>Sinergistes</i> oral clone E33_3 (1/19) <i>Granulicatella adiascens</i> (2/19) <i>Atopobium parvulum</i> (0/19) <i>Synergistes</i> oral clones BH017/D084 (1/19) <i>Synergistes</i> oral clone W090 (0/19) <i>Desulfobulbus</i> oral clone R004 (0/19) TM7 oral clone I025 (1/19) <i>Actinobaculum</i> oral clone EL030 (0/19) <i>Prevotella pallens</i> (0/19) |

Tabela 4. Microrganismos detectados através de métodos moleculares em amostras de abscessos periapicais agudos (continuação).

| Estudo | Método | Espécies (n ₊ /n _{total}) |
|--------------------------------|------------------------|--|
| Rôças <i>et al.</i> (2005b) | PCR Espécie-Específico | <i>Treponema parvum</i> (2/19) <i>Treponema putidum</i> (1/19) |
| Rôças <i>et al.</i> (2005c) | Nested-PCR | <i>Olsenella profusa</i> (1/15) <i>Olsenella uli</i> (3/15) |
| Rôças <i>et al.</i> (2006b) | Nested PCR | <i>Veillonella parvula</i> (4/19) <i>Eikenella corrodens</i> (5/19) |
| Siqueira & Rôças (2006a) | PCR Espécie-Específico | <i>Catonella morbi</i> (3/19) <i>Granulicatella adiascens</i> (2/19) |
| Siqueira <i>et al.</i> (2008a) | Nested PCR | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| Ozbek <i>et al.</i> (2009) | Real-Time PCR | <i>Treponema denticola</i> (24/30) |
| Rôças & Siqueira (2009) | Nested-PCR | <i>Bacteroidetes</i> clone X083 (3/21) <i>Prevotella baroniae</i> (5/21) <i>Prevotella multisaccharivorax</i> (1/21) |

Dymock *et al.* (1996) utilizaram as técnicas de cultura microbiana e os métodos de análise do polimorfismo de fragmentos terminais de restrição associado à clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA para identificar microrganismos em 3 amostras de abscessos periapicais agudos. Os anaeróbios estritos *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotalla buccae* e *Prevotella intermedia*, e os anaeróbios facultativos “*Streptococcus milleri*” e *Streptococcus mutans* foram isolados. O uso de métodos moleculares permitiu aos autores observarem a presença de filotipos bacterianos ainda não descritos. Houve uma predominância de clones de *Fusobacterium nucleatum*. Concluiu-se que a microbiota dos abscessos periapicais agudos é bastante diversificada, sendo composta principalmente por microrganismos anaeróbios estritos.

Entretanto, algumas espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* foram também isolados.

Wade *et al.* (1997) avaliaram a microbiota do aspirado de dois casos clínicos que apresentavam abscesso periapical agudo através de cultura microbiana, análise do polimorfismo de fragmentos terminais de restrição, análise de clones e seqüenciamento gênico. O método de cultura microbiana indica uma predominância das espécies *Parvimonas micra*, *Actinomyces* spp. e *Fusobacterium nucleatum*. Os métodos moleculares indicaram que 33,6% da microbiota era composta por *P. micra*, 66,2% por *Actinomyces* spp. e apenas 0,2% formada por *F. nucleatum*. A espécie *Porphyromonas endodontalis* foi encontrada através dos métodos moleculares, mas não foi isolada, sugerindo que a presença de alguns membros das comunidades microbianas pode ser subestimada pelos métodos de cultura. Os autores salientaram ainda que as técnicas empregadas podem ser extremamente úteis na caracterização de infecções em sítios saudáveis ou com doença, permitindo a caracterização de espécies cultiváveis ou ainda não-cultiváveis.

Siqueira *et al.* (2001d) utilizaram o método de hibridização DNA-DNA para detectar a presença de 49 espécies bacterianas em abscessos periapicais agudos. Uma média de 5.9 espécies foi detectada em cada amostra, variando de 1 a 33. As espécies mais freqüentemente detectadas foram *Bacteroides forsythus* (29.6%), *Porphyromonas gingivalis* (29.6%), *Streptococcus constellatus* (25.9%), *Prevotella intermedia* (22.2%), *Prevotella nigrescens* (22.2%), *Fusobacterium periodonticum* (18.5%), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (18.5%), e *Eikenella corrodens* (18.5%). Os resultados do estudo indicam que as infecções agudas periapicais são polimicrobianas, e sugerem que os métodos moleculares são bastante úteis na detecção de espécies de difícil cultivo ou ainda não-cultiváveis.

Rôças *et al.* (2006a) compararam a freqüência de espécies microbianas em amostras de abscessos periapicais agudos coletadas no Rio de Janeiro (RJ, Brasil) e em Portland (Oregon, EUA). A análise das amostras brasileiras

demonstrou uma prevalência das espécies *Treponema denticola* (73% dos casos), *Porphyromonas endodontalis* (70%) e *Tannerella forsythia* (57%). Entretanto, as amostras coletadas em Portland (Oregon, EUA) demonstraram maior frequência de *Dialister invisus* (70% dos casos), *Porphyromonas endodontalis* (63%) e *Dialister pneumosintes* (55%). Os achados confirmaram a hipótese de que a frequência de algumas espécies bacterianas em infecções endodônticas é marcadamente influenciada pela localização geográfica e por fatores intrapopulacionais.

Sakamoto *et al.* (2006), utilizando a análise de clones e a análise de fragmentos terminais de restrição, constataram diferenças estruturais importantes entre infecções endodônticas primárias sintomáticas e assintomáticas. A análise microbiológica de amostras de abscessos periapicais agudos revelou que o número de espécies foi significativamente maior que em amostras de infecções assintomáticas. Nos exsudatos de abscessos periapicais foram detectadas 18 taxa diferentes, sendo que *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Dialister pneumosintes*, *Prevotella* spp., e o clones orais de *Prevotella* spp. PUS9.180 e E9-42 foram detectados exclusivamente nestas amostras. A estrutura das comunidades bacterianas associadas a casos sintomáticos é diferente daquela observada em casos assintomáticos, e cerca de 20% das espécies detectadas não foi identificada ou ainda não é passível de cultivo.

Riggio *et al.* (2007) estudaram a composição da microbiota de abscessos periapicais agudos através da técnica de análise de clones e sequenciamento do gene 16S rRNA. As espécies *Prevotella oris*, *Prevotella oral* sp., *Dialister pneumosintes* e *Porphyromonas oral* sp foram as mais frequentemente detectadas e representam 47,6% da totalidade de clones seqüenciados. Aproximadamente 6% dos clones representaram espécies ainda não cultivadas. Os autores ressaltam a importância da utilização dos métodos moleculares de ampla detecção pois estes permitem a detecção de espécies de difícil cultivo e que podem ter participação ativa na formação e estabelecimento das lesões periapicais.

Sakamoto *et al.* (2009) estudaram a incidência de *Treponemas* orais em amostras de abscessos periapicais agudos através do método de Nested-PCR direcionado, para as espécies já cultivadas, e análise de clones e sequenciamento, para a detecção de novas espécies de *Treponema*. Dentre as espécies passíveis de cultivo, observou-se que *T. denticola*, *T. maltophilum* e *T. socranskii* foram freqüentemente detectadas, enquanto que nenhuma amostra apresentou a espécie *T. pectinovorum*. Dentre as espécies ainda não cultivadas, 17/18 não foram detectadas em outras infecções humanas. Os autores indicam que 64% dos clones de *Treponemas* necessitam ser ainda caracterizadas e isoladas.

A utilização de técnicas moleculares permite o estudo de características intrínsecas das cepas microbianas, relacionadas à sua virulência. Rôças & Siqueira (2010) detectaram a espécie *Porphyromonas gingivalis* em 7 de 25 amostras de abscessos periapicais agudos obtidos através do método de aspiração. A presença do gene *firmA* codifica a formação de fímbrias, que são importantes fatores de virulência das espécies de *P. gingivalis* e estes são divididos em 6 grupos. A detecção da presença e grupo de genes *firmA* foi determinada através de PCR, sendo as variantes II, III e IV as mais freqüentemente encontradas em casos de abscessos periapicais agudos.

2.6 TERAPIA ANTIMICROBIANA EM ENDODONTIA

A terapêutica clínica com o emprego de agentes antimicrobianos ou antibióticos tem se desenvolvido ao longo dos últimos 60 anos, sendo um dos principais pilares da medicina moderna (Hawkey, 2008). Na Odontologia, o tratamento das infecções orofaciais consiste na eliminação da origem de contaminação através da terapia endodôntica ou extração do elemento dental, e da drenagem cirúrgica da coleção purulenta (Flynn, 2000).

Na Endodontia o uso de agentes antimicrobianos está indicado para o tratamento dos abscessos periapicais agudos acompanhados de dor severa e celulite, linfadenite, trismo, febre taquicardia, falta de apetite e mal-estar geral, indicando para o profissional que os sistemas de defesa do paciente não estão conseguindo controlar o processo infeccioso (Wynn & Bergman, 1994; Andrade & Souza-Filho, 2006). Exceções à regra dizem respeito aos pacientes portadores de doenças sistêmicas caracterizadas por alterações metabólicas e por imunossupressão (Andrade & Souza-Filho, 2006).

Os antibióticos são substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos (bactérias ou fungos) que impedem o crescimento de outros microrganismos, eventualmente podendo destruí-los. No entanto, utiliza-se esse termo para descrever também os agentes antibacterianos sintéticos que não são produzidos por micróbios (Chambers & Sande, 1996). Chastre (2008) ressalta que um agente antimicrobiano ideal para uso empírico deve ser efetivo frente a uma ampla variedade de microrganismos, inclusive aos resistentes; deve ser altamente ativo no sítio da infecção (com mecanismos de farmacocinética e farmacodinâmica efetivos); e deve ser seguro e não-tóxico, com poucos efeitos adversos e de fácil utilização pelo paciente.

Para a seleção adequada de um antibiótico no tratamento de uma infecção é necessário que se tenha um conhecimento de fatores relativos aos agentes infectantes (microbiota mais comum das infecções, padrão habitual de sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos), à natureza da infecção que se vai tratar, às características do hospedeiro que vai receber o antibiótico e também aos aspectos básicos da farmacologia do antibiótico a ser utilizado (Rocha, 2002).

Os agentes antibióticos podem ser divididos em grupos, de acordo com a sua estrutura química: a) beta-lactâmicos, tais como as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, ácido clavulânico, carbapenens, nocardicinas e monobactâmicos; b) aminoglicosídeos, tais como a gentamicina, estreptomicina, neomicina, canamicina; c) lincosamidas, tais como a lincomicina e clindamicina; d) tetraciclina; e) cloranfenicol; f) macrolídeos, tais como a eritromicina, azitromicina

e claritromicina; g) glicopeptídeos, tais como vancomicina e teicoplanina; h) sulfonamidas.

Para Chambers & Sande (1996), do ponto de vista histórico, a classificação mais comumente empregada baseia-se no mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos, proposta da seguinte maneira:

- a) agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana (penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, ciclosserina, bacitracina);
- b) agentes que atuam diretamente sobre a membrana celular do microrganismo, afetando sua permeabilidade e resultando em extravasamento de compostos intracelulares (polimixinas);
- c) agentes que afetam a função das subunidades ribossômicas 30S e 50S, causando inibição reversível da síntese protéica (cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e clindamicina);
- d) agentes que se ligam à subunidade 30S e alteram a síntese protéica, resultando em morte celular (aminoglicosídeos);
- e) agentes que afetam o metabolismo dos ácidos nucléicos (rifampicina e quinolonas); e,
- f) agentes que bloqueiam rotas metabólicas importantes dos microrganismos (trimetropina e sulfonamidas).

Os principais grupos de antibióticos empregados na clínica odontológica são as penicilinas, as cefalosporinas, as tetraciclina, as lincosaminas e os macrolídeos (Groppo *et al.*, 2006).

De acordo com Silva (2002), as penicilinas são classificadas a partir das características de sua estrutura, provenientes das modificações realizadas na molécula do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), o qual apresenta um anel beta-

lactâmico, essencial para a atividade antimicrobiana. Dentro do grupo das penicilinas naturais, encontram-se as Penicilinas G e V. Modificações laboratoriais permitiram a fabricação de penicilinas penicilinase-resistentes tais como metilcilina, nafcilina e oxacilina. Um terceiro grupo é constituído pelas penicilinas de espectro ampliado, como a ampicilina e a amoxicilina. Os mais recentes antibióticos β -lactâmicos são o imipenen, meropenem e aztreonam. O espectro antimicrobiano das penicilinas mais comumente empregadas em Odontologia é resumido por Groppo *et al.* (2006):

- a) Penicilinas G – apresentam pequeno espectro de ação, atuando principalmente sobre cocos Gram-positivos, anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*.
- b) Penicilina V – espectro de ação reduzido, com potência um pouco inferior à Penicilina G, não atuando contra bactérias produtoras de beta-lactamases.
- c) Amoxicilina e Ampicilina – são menos ativas que as penicilinas G e V frente a cocos Gram-positivos, mas em compensação oferecem uma atividade adicional contra cocos e bacilos Gram-negativos.

Dentre os agentes antimicrobianos empregados, os β -lactâmicos são as drogas mais seguras, mas certas classes apresentam efeitos adversos como indução de reações de hipersensibilidade e supressão de atividade hematopoiética da medula óssea (Owen, 2008b).

As cefalosporinas foram isoladas inicialmente do fungo *Cephalosporium acremonium*, e tem como núcleo o ácido 7-aminocefalosporânico que, com acréscimo de cadeias laterais, permitiu o desenvolvimento de compostos semi-sintéticos com atividade antibacteriana muito maior que a substância adicional (Chambers & Sande, 1996). A classificação mais aceita para as cefalosporinas as divide em gerações, baseada nas características gerais da atividade

antimicrobiana (Rocha, 2002). As cefalosporinas de primeira geração são representadas pela cefalotina, cefazolina, cefapirina e cefalexina e caracterizam-se por um espectro de ação entre Gram-positivos e Gram-negativos, porém mais estreito que os demais grupos. A segunda geração consiste no cefamandol, cefoxitina e no cefaclor, tendo maior atividade contra bactérias entéricas Gram-negativas que as de primeira geração. As cefalosporinas de terceira geração possuem espectro antibacteriano ainda mais amplo contra as bactérias Gram-negativas, inclusive contra bactérias resistentes a outras cefalosporinas. Neste grupo encontramos a cefotaxima, moxalactama, cefoperazona e ceftriazona. O recente desenvolvimento de novos fármacos desse grupo permitiu o surgimento da quarta geração de cefalosporinas, com efeito mais intenso sobre bacilos Gram-negativos como a *Pseudomonas aeruginosa* e uma eficácia considerável contra Gram-positivos, especialmente estafilococos e enterococos. A falta de atividade das cefalosporinas de primeira e terceira geração contra bactérias anaeróbias da cavidade oral pode limitar sua utilidade no tratamento de infecções dentárias, como abscessos periapicais, com microbiota bacteriana constituída principalmente por anaeróbios estritos (Montgomery, 2000).

As lincosamidas foram desenvolvidas a partir de 1962 e, dentre elas, a clindamicina é a mais freqüentemente empregada em Odontologia. A clindamicina é um fármaco bastante ativo contra a maioria das bactérias anaeróbias estritas, especialmente o *Bacteroides fragilis* (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996). Assim como as demais lincosamidas, a clindamicina tem boa penetração em muitos tecidos, sua concentração no tecido ósseo é particularmente elevada (Carvalho, 2002), além de se acumular nos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos alveolares e nos abscessos (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996). A reação adversa mais freqüentemente encontrada é a diarreia, que ocorre em torno de 10 a 15% dos indivíduos tratados, provavelmente como consequência de sua ação direta na mucosa intestinal e sua microbiota (Groppo *et al.*, 2006). Uma complicação do uso de clindamicinas é o surgimento de colite pseudomembranosa. Owens *et al.* (2008) relataram que um controle mais efetivo no uso de clindamicina tem reduzido o surgimento desta patologia, uma vez que a quebra do equilíbrio da microflora intestinal produzido

pelo medicamento favorece o crescimento de *Clostridium difficile* e liberação de suas toxinas. A clindamicina deve ser considerada a terceira opção no tratamento das infecções orodentais causadas por cocos Gram-positivos ou anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos sensíveis, quando as penicilinas e macrolídeos não podem ser utilizados ou são ineficazes (Montgomery, 2000).

O metronidazol manifesta atividade antimicrobiana contra cocos anaeróbios, bacilos aeróbios Gram-negativos, incluindo espécies de *Bacteroides*, e bacilos anaeróbios Gram-positivos formadores de esporos. É empregado, portanto em diversas infecções causadas por bactérias anaeróbias estritas, incluindo *Clostridium* e *Helicobacter* (Tracy & Webster, 1996). Este fármaco foi empregado inicialmente para o tratamento da tricomoníase vaginal e doenças causadas por protozoários como amebíase e giardíase (Groppo *et al.*, 2006). O seu emprego em Odontologia para o tratamento das infecções por anaeróbios iniciou-se com as observações de Shinn (1962), que constatou a melhora das condições periodontais de uma paciente que estava em tratamento para tricomoníase. Durante o seu uso, os pacientes devem ser alertados para evitar o consumo deste medicamento com bebidas alcoólicas, pois o metronidazol apresenta um efeito similar ao dissulfiram (Tracy & Webster, 1996). Segundo Montgomery (2000), o seu uso em Odontologia se limita às infecções periodontais agressivas e em associação para o tratamento de infecções orofaciais causadas por microrganismos anaeróbios estritos.

A eritromicina pertence à categoria dos antibióticos macrolídeos, juntamente com a azitromicina e a claritromicina que foram desenvolvidas posteriormente, sendo os derivados sintéticos mais modernos deste grupo (Carvalho & Carvalho, 2002). As eritromicinas apresentam-se comercialmente na forma de drágeas revestidas, pois são facilmente inativadas pelo suco gástrico, dissolvendo-se apenas quando atingem o duodeno (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996). Apresentam-se como antibióticos de largo espectro com atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micoplasmas, clamídias, treponemas e riquetsias (Carvalho & Carvalho, 2002). Primariamente são bacteriostáticos, mas em altas

doses podem ser bactericidas (Groppo *et al.*, 2006). A adição de um átomo de nitrogênio no anel lactônico da eritromicina originou a azitromicina, conferindo-lhe maior penetração tissular e um espectro mais amplo que a eritromicina, principalmente frente às bactérias anaeróbias tais como *Peptostreptococcus* e *Clostridium* (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996). Por apresentar uma meia-vida biológica prolongada em nível tecidual, mantendo concentrações ativas por períodos de até 10 dias no local da infecção, a azitromicina pode ser administrada em dose única diária e por apenas três dias de tratamento (Groppo *et al.*, 2006). Historicamente, a eritromicina ocupa o segundo lugar depois das penicilinas para o tratamento das infecções dentárias, principalmente em casos onde antibióticos β -lactâmicos seriam indicados, mas não podem ser administrados devido à alergia medicamentosa. A azitromicina constitui um fármaco alternativo para a cobertura profilática contra endocardite bacteriana em pacientes suscetíveis e que são alérgicos à penicilina (Montgomery, 2000).

2.6.1 Desenvolvimento de Resistência aos Agentes Antimicrobianos

Em 1956, Jawetz relatou que a terapêutica antimicrobiana para as infecções era simples, efetiva e com baixo custo. Da mesma forma, comparando-se com tempos anteriores, constatou que a mortalidade e a morbidade causadas por doenças bacterianas haviam decrescido significativamente e não constituíam problemas sem solução para a área médica.

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos em todo o mundo têm demonstrado aumento nas taxas de resistência microbiana aos agentes terapêuticos empregados e, em muitos casos, os patógenos têm sido denominados de “panresistentes” ou “extremamente resistentes” (Owens Jr, 2008b). A emergência de resistência bacteriana não respeita limites geográficos e o trânsito populacional entre as diversas regiões do planeta tornam este um problema global (Hawkey, 2008). Dessa forma, os antibióticos representam uma

das poucas classes de drogas que tem o potencial de afetar populações além do paciente que está sendo tratado (Handal & Olsen, 2000).

Em estudo epidemiológico na Noruega, Al-Haroni & Skaug (2007) constataram que os Cirurgiões-dentistas são responsáveis pela prescrição de 8% do total de antibióticos consumidos anualmente, distribuídos preferencialmente em β -lactâmicos, macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina. Palmer *et al.* (2000) investigaram o tipo, a dose, a frequência e o tempo de uso indicado nas prescrições de antimicrobianos por Cirurgiões-Dentistas na Inglaterra e constataram que várias das prescrições continham falhas, principalmente relacionadas à frequência, dose e duração da terapêutica. Handal & Olsen (2000) relatam que existem evidências da ocorrência de um acréscimo nos padrões de resistência microbiana da flora oral nos últimos 10 a 15 anos.

As bactérias podem se tornar resistentes a um agente antimicrobiano quando o fármaco não consegue atingir seu alvo, o fármaco é inativado ou o alvo está alterado (Chambers & Sander, 1996).

Segundo Silva (2002), a resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada em natural (intrínseca) e adquirida (cromossômica ou extra-cromossômica). A resistência natural é aquela inerente à célula bacteriana, independente de sua exposição a um determinado antibiótico, determinada principalmente por dificuldade de permeabilidade das superfícies externas das células bacterianas. Já a resistência adquirida surge quando cepas originalmente sensíveis tornam-se resistentes após a exposição ao agente antimicrobiano, resultando de uma alteração genética determinada por mutações ou aquisição de plasmídios.

Os três mecanismos relatados na literatura que explicam o surgimento de resistência aos antibióticos β -lactâmicos são a produção de enzimas capazes de destruir o antibiótico (β -lactamases), a diminuição da afinidade dos receptores de penicilinas nas paredes celulares bacterianas e a restrição da entrada do antibiótico no interior celular (Babic *et al.*, 2006).

O mecanismo mais eficiente de resistência aos β -lactâmicos é a produção de enzimas, detectadas principalmente em bactérias do gênero *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e anaeróbios como *Bacteriodes fragilis*, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., e *Clostridium* spp. (Williams, 1999). Nos últimos anos, o isolamento de cepas bacterianas capazes de produzir β -lactamases aumentou devido à rápida transmissibilidade genética, tanto intra- quanto inter-espécies (Geddes *et al.*, 2007). Babic *et al.* (2006) relataram que existem mais de 530 tipos de enzimas capazes de degradar essa classe de antibióticos.

Em 1980, Heimdahl *et al.* foram os primeiros pesquisadores a relatar o surgimento de dificuldades no tratamento de infecções orais empregando-se penicilinas devido à presença de cepas produtoras de β -lactamases.

A literatura relata duas maneiras de superar a resistência bacteriana: modificar a estrutura do antibiótico, fazendo que ele não seja mais um substrato para a enzima; ou, inibir a ação da enzima empregando um composto que é estruturalmente similar ao antibiótico β -lactâmico (Medeiros, 1997; Handal & Olsen 2000; Babic *et al.*, 2006).

A modificação de compostos gera o descobrimento e síntese de novas drogas capazes de atuar sobre os receptores de β -lactâmicos e não serem sensíveis às β -lactamases. Surgiram assim as cefalosporinas de amplo espectro ou carbapenêmicos e, mais recentemente, encontra-se em desenvolvimento o β -lactâmico BAL-5788 (Shah, 2005).

Os inibidores de β -lactamases são compostos semelhantes às penicilinas, com modificações nas cadeias laterais que têm a capacidade de se ligar irreversivelmente às enzimas, tornando-as inativas (Williams, 1999). Três drogas inibidoras de β -lactamases estão disponíveis para emprego clínico, via oral ou parenteral. O ácido clavulânico foi a primeira droga inibidora de β -lactamases isolada e está disponível para uso em associação com a amoxicilina desde 1994.

O Sulbactam e o Tazobactam são derivados semi-sintéticos do ácido penicilônico e podem ser associados à ampicilina e amoxicilina, no entanto, são empregados preferencialmente em via parenteral (Medeiros, 1997).

Em revisão de literatura, Hecht (2006) descreveu os mecanismos que cada gênero bacteriano desenvolve para resistir à ação dos agentes antimicrobianos. *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. são resistentes às penicilinas principalmente pela produção de β -lactamases, enquanto que sua resistência à clindamicina está associada à presença dos genes *ermF* e *ermG*. Entre as espécies de *Fusobacterium*, a existência de resistência às penicilinas é incomum e a produção de β -lactamases é rara. Microrganismos pertencentes ao gênero *Peptostreptococcus* são pouco resistentes às penicilinas, clindamicina e metronidazol, sendo bastante susceptíveis aos inibidores de β -lactamases e cefalosporinas.

2.6.2 Avaliação de Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos e sua Aplicação Clínica

Nos testes *in vitro*, a suscetibilidade dos microrganismos está dividida em categorias, baseadas na sua resposta frente às diferentes concentrações de antibióticos encontradas no sangue ou tecidos, obtidas após a utilização do fármaco pelo paciente (*Clinical and Laboratorial Standards Institute - CLSI*, 2007). Para tanto, define-se como Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede a visualização do crescimento de um microrganismo disperso em Agar ou suspenso em meios líquidos. Assim, têm-se três classes:

- a) Suscetíveis – os isolados clínicos são inibidos por concentrações do agente antimicrobiano que são facilmente atingíveis quando a dose recomendada do fármaco é utilizada.

- b) Intermediários – incluem isolados clínicos com CIMs que se aproximam daquelas obtidas no sangue e nos tecidos, mas com resposta inferior à dos microrganismos considerados sensíveis. Como sua CIM é mais elevada, para que o medicamento seja efetivo ele deve atingir concentrações sanguíneas ou teciduais mais elevadas no sítio da infecção, tanto por características inerentes de biodisponibilidade quanto por fatores de maior dosagem.
- c) Resistentes – categoria onde os isolados não são inibidos pelas concentrações tissulares ou sanguíneas passíveis de serem atingidas pelo fármaco.

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) sugere em seu documento M11-A7 (2007) que a suscetibilidade dos microrganismos anaeróbios pode ser testada através do método de diluição em caldo, o método de diluição em Agar e o Epsilometer Test (E-test), e tem como objetivo determinar as concentrações inibitórias mínimas de um antibiótico necessárias para atuar sobre os isolados clínicos.

O emprego do E-test foi descrito inicialmente por Citron *et al.* (1991). O sistema do E-test consiste em uma fita plástica inerte e não-porosa de 50 mm de comprimento e 5mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita do E-test pode detectar uma CIM que varia de 0.016 a 256 µg/mL, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993). De acordo com os autores, este é um método de rápida e simples realização, permitindo quantificar numericamente os valores de CIM para cada cepa.

Em 1992 ainda não haviam sido estabelecidos padrões estritos para testes de suscetibilidade e Goldstein *et al.* buscaram conhecer como os diversos centros de saúde nos Estados Unidos processavam e realizavam estes testes. Dentre as várias constatações, observaram que a maioria dos hospitais realizava

cultura de microrganismos anaeróbios e testes de sensibilidade a antimicrobianos. As principais dificuldades encontradas eram o tempo necessário para a sua realização e a demora no envio dos resultados. Os autores sugeriram então o emprego do E-test, como uma forma prática e mais rápida de avaliação. Dentre as vantagens encontram-se a facilidade de execução e leitura, além de diminuir o tempo entre a coleta e a obtenção dos resultados. Em 1995, Goldstein *et al.* observaram que ainda não havia sido realizada uma padronização nas metodologias de realização dos testes de suscetibilidade para microrganismos anaeróbios nos Estados Unidos e salientaram ainda a necessidade de desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficazes de avaliação. Comparando-se os dados dos dois estudos anteriores, Goldstein *et al.* (2008) constataram um aumento na utilização de testes laboratoriais nos hospitais norte-americanos, uma vez que se observou uma tendência à terceirização do serviço. No entanto, um número maior de laboratórios tem empregado o E-test como teste de escolha, seguido do método de diluição em caldo, enquanto que nenhum laboratório relatou o emprego do método de disco-difusão. Os antibióticos mais freqüentemente testados foram penicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e ampicilina/sulbactam. De acordo com os autores, embora avanços tenham sido obtidos, ainda não há uma padronização para a identificação e realização dos testes de suscetibilidade nos hospitais dos Estados Unidos.

Estudos de Brook *et al.* (1981), sugeriram a presença de microrganismos resistentes a antibióticos do grupo das penicilinas em abscessos periapicais agudos em crianças. Os autores relataram que 33% dos pacientes apresentavam isolados microbianos produtores de beta-lactamases, pertencentes às espécies *Bacteroides melaninogenicus* e *Bacteroides oralis*.

Von Konow *et al.* (1981) observaram que a maioria dos microrganismos facultativos isolados em abscessos periapicais foi sensível à penicilina, enquanto que cepas anaeróbias do grupo "*Bacteroides*" foram resistentes a esses fármacos, devido à presença de enzimas beta-lactamases. Entretanto, as mesmas cepas foram sensíveis à clindamicina. A eritromicina demonstrou ser mais efetiva frente

aos microrganismos anaeróbios facultativos, pois 20% dos microrganismos anaeróbios estritos apresentaram concentrações inibitórias mínimas elevadas, superiores a 1,0µg/mL.

Sklavounos *et al.* (1986) relataram que a suscetibilidade dos microrganismos anaeróbios estritos isolados de abscessos periapicais agudos é variável, dependendo do agente antimicrobiano empregado. A cefoxitina foi efetiva frente a 85% dos isolados, seguida de cloranfenicol e tetraciclina (80%), eritromicina (75%), penicilina (70%), clindamicina (60%) e metronidazol (57,5%). Neste estudo, a maioria dos pacientes recebeu antibioticoterapia com ampicilina, que demonstrou ser inefetiva. Dentre outros motivos, a inacessibilidade do fármaco em concentrações adequadas no sítio da infecção foi relatada como sendo o principal motivo para o insucesso da terapia. Os autores salientam ainda que os agentes antimicrobianos são auxiliares durante o tratamento dos abscessos periapicais, que é realizado através da drenagem e debridamento tecidual.

Bernal *et al.* (1998) observaram que cepas de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* apresentavam padrões distintos de sensibilidade aos antibióticos amoxicilina e amoxicilina/ácido clavulânico. Em 25% das cepas, altos valores de CIM foram encontrados para a amoxicilina. No entanto, essas bactérias foram bastante sensíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico, sugerindo uma produção de beta-lactamase, confirmada através do teste de nitrocefina. Ao ser realizada uma reação de PCR específica para estas cepas, constatou-se que 25% delas eram *Prevotella intermedia* e 75% eram *Prevotella nigrescens*, demonstrando uma maior participação destas últimas quando se detecta clinicamente uma resistência aos antibióticos beta-lactâmicos.

Ao estudarem a microbiota de abscessos odontogênicos e bolsas periodontais, Eik *et al.* (1999) constataram que as espécies de *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* foram 100% sensíveis à clindamicina e ao metronidazol. No entanto, uma pequena porcentagem de *Prevotella* não-

pigmentadas foi resistente à clindamicina. Para as mesmas espécies, taxas de resistência entre 16,7 e 41,4% foram observadas quando foi testada a penicilina.

Hecht *et al.* (1999) relataram o aumento dos níveis de resistência dos microrganismos anaeróbios frente a diversos antibióticos no período de 1991 a 1996 em hospitais de Chicago (Illinois, EUA). Os autores salientam que mesmo com altos índices de resistência, a frequência de execução de testes laboratoriais de sensibilidade tem diminuído, principalmente devido à falta de recursos, carência de profissionais treinados e à ausência de interesse em correlacionar os dados laboratoriais aos achados clínicos.

Schumacher *et al.* (1999) avaliaram a suscetibilidade de 10 espécies de *Prevotella* spp aos antibióticos, através dos métodos de diluição em Agar e E-test. Os autores constataram que dentre as espécies do gênero *Prevotella*, a resistência à penicilina era pequena, exceto para as cepas de *Prevotella bivia* e *Prevotella buccae*. A clindamicina mostrou-se bastante eficaz frente às bactérias desse gênero, enquanto que a resistência à tetraciclina e à eritromicina foi freqüente, especialmente para cepas de *Prevotella bivia* e *Prevotella disiens*. Ao testar a suscetibilidade das cepas ao metronidazol, diferenças importantes foram verificadas dependendo do método empregado. Das cepas sensíveis ao metronidazol quando a diluição em Agar foi realizada, 11,3% delas demonstrou-se resistente no E-test. Segundo os autores, não se sabe ainda qual a razão desse fato, mas sugerem que possa estar associado à formação de algum composto do metronidazol que é dependente da ausência do oxigênio, uma vez que o medicamento presente no método E-test seria mais afetado pelo oxigênio que aquele diluído no Agar.

Kuriyama *et al.* (2000) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana e incidência e produção de beta-lactamase para cepas de bacilos anaeróbios Gram-negativos em infecções odontogênicas. Cerca de 35,6% das espécies de *Prevotella* pigmentadas e 31,9% das *Prevotella* não-pigmentadas eram produtoras de beta-lactamases. Cepas bacterianas pertencentes às espécies *Porphyromonas* e *Fusobacterium* não foram positivas para este teste. Os antibióticos beta-

lactâmicos foram efetivos frente à *Porphyromonas* spp e *Fusobacterium* spp. A eritromicina teve uma baixa atividade frente às *Prevotella* não-pigmentadas e a *Fusobacterium* spp. O metronidazol e a clindamicina foram eficazes contra todas as espécies testadas.

Letournel-Glomaud *et al.* (2003) demonstraram através do método E-test a suscetibilidade de 194 cepas de anaeróbios isolados de amostras clínicas de infecções humanas e concluíram que há uma grande porcentagem delas resistente à benzilpenicilina, mas sensíveis à amoxicilina associada ao ácido clavulânico. No entanto, o metronidazol foi efetivo contra todas as cepas testadas, exceto bacilos positivos não-formadores de esporos tais como *Propionibacterium acnes* e cerca de 45% das cepas de *Parvimonas micra*.

Santos *et al.* (2002) determinaram através do método de diluição em agar, a suscetibilidade de cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens* isoladas de bolsas periodontais a seis agentes antimicrobianos. Os autores observaram que todas as cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens* foram suscetíveis à penicilina G, eritromicina, meropenem, metronidazol e tetraciclina. No entanto, 37% das cepas foram resistentes à clindamicina.

Ao estudarem a microbiota de abscessos periapicais e sua suscetibilidade aos agentes antimicrobianos freqüentemente prescritos em Odontologia, Baumgartner & Xia (2002) observaram que 15% das bactérias foram resistentes à penicilina V, 55% ao metronidazol, 9% à amoxicilina, 4% à clindamicina e nenhuma à amoxicilina/ácido clavulânico. Quando foi empregada a associação penicilina V + metronidazol e amoxicilina + metronidazol, índices de suscetibilidade de 93% e 99% foram obtidos, respectivamente. Assim, sugeriu-se que a associação de antibióticos beta-lactâmicos ao metronidazol continua sendo eficaz clinicamente, mesmo quando se tem altas taxas de resistência ao metronidazol.

Lõivukene & Naaber (2003) correlacionaram o desenvolvimento de resistência bacteriana em microrganismos anaeróbios ao consumo de diferentes

agentes antimicrobianos na Estônia, no período compreendido entre 1999 e 2001. A resistência ao metronidazol não foi observada em bactérias Gram-negativas apesar do alto consumo desta droga. No entanto, altas taxas de resistência à clindamicina foram constatadas embora esse fármaco fosse pouco prescrito. Cerca de 48,8% de bactérias do grupo do *Bacteroides fragilis*, 22,7% de *Fusobacterium* spp., 37,5% de *Porphyromonas* spp., 62,7% de *Prevotella* spp., 18,6% de *Peptostreptococcus* spp., e 18,2% dos demais bacilos Gram-positivos eram produtores de β -lactamases. Não foi observada correlação positiva entre as alterações no consumo de antibióticos e o desenvolvimento de resistência no período de três anos. As possíveis explicações para esse fato seriam que a pressão seletiva sobre os microrganismos promovida pelos antibióticos é lenta, e que a origem dos microrganismos que causam infecções anaeróbicas é do próprio hospedeiro e não do ambiente externo. Os autores sugerem também que o monitoramento local do desenvolvimento de resistência é uma referência importante para uma adequada prescrição de agentes antimicrobianos, de acordo com as características geográficas regionais.

Sousa *et al.* (2003) avaliaram a suscetibilidade de microrganismos anaeróbios isolados de canais radiculares de dentes associados à abscessos periapicais frente aos antibióticos penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol, clindamicina, eritromicina e azitromicina. Todas as cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum* foram sensíveis aos agentes antimicrobianos. Apenas 36,4% das cepas de *Fusobacterium necrophorum* foram resistentes à eritromicina. Todos os isolados não foram capazes de degradar o substrato nitrocefim e forneceram resultado positivo ao teste de produção de beta-lactamases.

Chan & Chan (2003) constataram que a microbiota das infecções odontogênicas é constituída principalmente por anaeróbios facultativos Gram-positivos e anaeróbios estritos Gram-negativos. Foram testadas diversas concentrações de antibióticos presentes nas fitas de E-test frente aos isolados clínicos e observaram-se altas taxas de sensibilidade à clindamicina para os

microrganismos anaeróbios, exceto *Eikenella corrodens*. A amoxicilina e a associação amoxicilina/ácido clavulânico foram bastante efetivas frente a *Fusobacterium nucleatum* (88,6% e 91,4%), *Prevotella intermedia* (86,2% e 96,6%) e *Porphyromonas gingivalis* (95,7% e 95,7%). Dentre os antibióticos com maiores taxas de resistência encontra-se a eritromicina, com valores de 48,6% para *Fusobacterium nucleatum*; 55,2% para *Prevotella intermedia*; 55,6% para *Parvimonas micra*; e, 43,4% para *Porphyromonas gingivalis*. Concluiu-se que a atividade dos antimicrobianos empregados freqüentemente em Odontologia teve sua ação diminuída frente aos patógenos endodônticos em Taiwan.

Em 2007, Kuriyama *et al.* publicaram um trabalho que demonstrou a suscetibilidade de 800 isolados clínicos de infecções odontogênicas a 13 antibióticos. Espécies do gênero *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Peptostreptococcus* foram submetidas aos antimicrobianos amoxicilina, amoxicilina e ácido clavulânico, cefaclor, cefuroxima, cefcapena, cefdinir, eritromicina, azitromicina, telitromicina, minoxiciclina, levofloxacino, clindamicina e metronidazol através do método de diluição em Agar. A partir dos resultados, observou-se que a amoxicilina pode ser empregada como a droga de primeira escolha, embora as espécies pertencentes ao gênero *Prevotella* demonstrem baixa suscetibilidade a esses agentes. A amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina e metronidazol são alternativas bastante úteis para o tratamento de infecções dento-alveolares.

Jacinto (2007) analisou a microbiota de canais radiculares com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa, objetivando também quantificar endotoxinas presentes e avaliar a sensibilidade dos isolados clínicos a agentes antimicrobianos freqüentemente empregados em Endodontia (penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, metronidazol e azitromicina). Todas as cepas de *Parvimonas micra* foram suscetíveis aos agentes testados. Resistência à eritromicina foi observada para as cepas de *Fusobacterium nucleatum* (30%), *Prevotella oralis* (12,5%), *Fusobacterium necrophorum* (26,7%) e *Porphyromonas gingivalis* (9%). *Prevotella oralis* e *Porphyromonas gingivalis*

foram suscetíveis aos demais antibióticos testados. As cepas de *Fusobacterium nucleatum* foram bastante sensíveis à amoxicilina (100%), amoxicilina + ácido clavulânico (100%), metronidazol (100%), penicilina G (96,7%) e metronidazol (96,7%). *Fusobacterium necrophorum* foi suscetível à amoxicilina (100%), amoxicilina + ácido clavulânico (100%), metronidazol (93,4%), clindamicina (86,7%) e penicilina G (86,7%).

Martinho (2007) avaliou a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos em isolados bacterianos provenientes de canais radiculares que não se apresentavam com sintomatologia dolorosa espontânea. Verificaram que 100% das espécies de *Peptostreptococcus prevotii*, *Fusobacterium varium*, *Prevotella buccae*, *Prevotella oralis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii* e *Fusobacterium necrophorum* eram suscetíveis à amoxicilina. Resistência à amoxicilina foi observada em *P. intermedia* (20%), *F. nucleatum* (25%) e *P. micra* (8,43%). Todas as bactérias foram suscetíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico. *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* foram suscetíveis em 50%, 70% e 75%, respectivamente, à clindamicina. Benzilpenicilina foi eficaz contra 75% das cepas de *Peptostreptococcus prevotii*, 91,66% de *Parvimonas micra*, 50% de *Fusobacterium nucleatum* e 60% das cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens*. Metronidazol foi eficaz contra 50% das cepas testadas da espécie *P. prevotii*, 66,66% de *P. micra*, 70% de *P. intermedia/nigrescens* e 75% de *P. gingivalis*.

A microbiota das infecções de canais radiculares com necrose pulpar e de abscessos periapicais agudos tem sido tradicionalmente estudada através dos métodos de cultura microbiana e recentemente complementada por métodos moleculares (Munson *et al.*, 2002; Rôças *et al.* 2002b; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2007; Riggio *et al.*, 2007). Diversas espécies microbianas cultiváveis, de difícil cultivo e ainda não cultivadas, além de clones orais e microrganismos pertencentes ao domínio *Archaea* são associados a tais infecções, constituindo comunidades únicas e complexas (Sakamoto *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2009). O

estabelecimento de um abscesso periapical agudo está condicionado à presença de uma infecção altamente virulenta no interior dos canais radiculares, que superou o sistema de defesas do organismo (Torabinejad, 1994). Configura-se assim uma situação ímpar, com infecções em ambientes vizinhos e que apresentam uma origem correlata. Entretanto, não são observados na literatura relatos da descrição ampla da estrutura e da composição da microbiota em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais obtidas de um mesmo indivíduo, relacionado ao mesmo elemento dental. A deficiência transitória das defesas do organismo em conter o processo infeccioso pode gerar situações clínicas complexas (Morse, 1987). O emprego de agentes antimicrobianos é necessário como auxiliar aos procedimentos locais para a desestruturação das comunidades microbianas, através da descontaminação do sistema de canais radiculares e drenagem do exsudato periapical (Flynn, 2000). Assim, torna-se necessário determinar a suscetibilidade destes microrganismos, provenientes de ambos os ecossistemas, para que seja possível guiar as escolhas e determinar os regimes de prescrição dos antibióticos.

O presente estudo aborda as situações acima descritas, envolvendo o estudo das comunidades microbianas em ambos ecossistemas e a suscetibilidade antimicrobiana de espécies anaeróbias mais freqüentemente isoladas.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Caracterizar as comunidades microbianas presentes em canais radiculares com necrose pulpar e em abscessos periapicais agudos relacionados ao mesmo elemento dental através dos métodos da análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos terminais de restrição (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) e cultura microbiana;
2. Detectar a presença de microrganismos anaeróbios estritos de difícil cultivo, do gênero *Treponema*, e de *Enterococcus faecalis* através das técnicas de PCR e/ou *Nested PCR*;
3. Estabelecer a relação de similaridade entre os perfis microbianos das amostras de canais radiculares e abscessos periapicais através do método de Análise de Agrupamento; e,
4. Comparar *in vitro* a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias pertencentes aos gêneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* isolados de canais radiculares e de abscessos periapicais através do método de E-test.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Foram selecionados 20 pacientes que compareceram ao Plantão de Urgências da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo – Brasil, apresentando dentes com necrose pulpar, abscesso periapical agudo e edema, relatando dor espontânea. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP – antes de participar da pesquisa (**Anexo I e Apêndice I**).

4.2 ASPECTOS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS

Para cada indivíduo foram anotados: idade, sexo, estado pulpar, natureza da dor, profundidade da sondagem periodontal, mobilidade, sensibilidade à percussão horizontal e vertical, sensibilidade à palpação periapical, presença de edema dos tecidos periapicais, tempo decorrido do início do edema, história de antibioticoterapia prévia ou outra medicação e os achados radiográficos detectados na radiografia periapical de diagnóstico, obtida a partir da área em que a patologia se encontrava situada. Foram anotados os aspectos físicos do canal durante a coleta das amostras, tais como canal seco, presença de exsudato claro, purulento ou hemorrágico do canal radicular. Os aspectos clínicos do dente envolvido, tais como presença ou não de cáries e restaurações e a localização do abscesso periapical foram também registrados.

Para serem incluídos na pesquisa, os pacientes não poderiam ter feito uso de antibióticos num período mínimo de 3 meses, para não interferir na microbiota dos canais radiculares. Da mesma forma, caso não fosse possível realizar isolamento absoluto do campo operatório, casos de impossibilidade de introdução do cone de papel no canal radicular até as proximidades do comprimento aparente do dente na radiografia, e se houvesse exposição direta da câmara pulpar ou do canal radicular ao meio bucal impossibilitavam a participação do indivíduo na pesquisa.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas na Clínica de Especialização da FOP-UNICAMP e as amostras processadas no Laboratório de Microbiologia Endodôntica da FOP-UNICAMP (Piracicaba, São Paulo, Brasil e no Laboratório de Microbiologia Periodontal “The Ohio State University” (OSU, Columbus, Ohio, Estados Unidos). Os métodos empregados foram descritos anteriormente por Gomes *et al.* (1994a,b; 1996; 2004), Rôças *et al.* (2002a), Riggio *et al.* (2007) e Montagner (2009).

4.3.1 Canal Radicular

Para a coleta da amostra do canal radicular, a região do elemento dental envolvido foi anestesiada localmente. Todos os contaminantes coronários tais como cáries e restaurações defeituosas foram removidos. O dente envolvido recebeu polimento coronário e foi isolado com lençol de borracha. A seguir, aplicou-se o selador de interfaces cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, São Paulo, Brasil) para evitar infiltração de saliva e fluido gengival.

A anti-sepsia do campo operatório foi realizada com *swabs* esterilizados umedecidos inicialmente com água oxigenada 30 v/v, e depois com solução de hipoclorito de sódio 5,25% por 30 segundos cada. A neutralização destes compostos foi realizada com solução de tiosulfato de sódio 5% esterilizado (Möller, 1966). Através de um *swab* esterilizado, amostras foram coletadas do campo operatório para verificar a efetividade da esterilidade do mesmo.

Com a interrupção do fornecimento de água proveniente do equipo, a irrigação direcionada à ponta diamantada esférica esterilizada empregada em alta rotação passou a ser realizada com soro fisiológico esterilizado. Após a confecção da cavidade de acesso com pontas diamantadas sem extremidade ativa, obteve-se completo acesso ao canal radicular.

As amostras dos canais radiculares foram coletadas utilizando-se três cones de papel estéreis de calibre 20 e conicidade FM (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro). Em casos de dentes multirradiculares, as amostras foram coletadas do canal mais amplo, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico.

Os cones de papel foram introduzidos próximo ao comprimento total do canal radicular determinado na radiografia pré-operatória, permanecendo em posição por 1 minuto sob fluxo contínuo de nitrogênio a fim de preservar a viabilidade dos microrganismos anaeróbios estritos (Berg & Nord, 1973). Quando os canais radiculares estavam secos, os mesmos eram umedecidos com soro fisiológico, com o objetivo de assegurar uma amostra viável. Ao serem retirados do canal, os cones eram introduzidos seqüencialmente em tubos plásticos do tipo “Eppendorf” com capacidade de 1,5 mL, contendo 1,0mL de meio de transporte VMGA III (**Apêndice II**). Esta amostra foi imediatamente transportada para o laboratório de Microbiologia Endodôntica da FOP-UNICAMP para processamento, que ocorreu imediatamente após o término do procedimento clínico, nunca ultrapassando um período de 4 horas, garantindo a viabilidade celular necessária para a recuperação dos microrganismos através da técnica de cultura microbiana.

Após a coleta das amostras dos canais radiculares, realizou-se o preparo químico-mecânico empregando-se a Técnica Cérvico-apical da FOP-UNICAMP e clorexidina 2% gel associada ao soro fisiológico esterilizado. Os canais radiculares receberam medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e clorexidina 2% gel. Os elementos dentais foram restaurados com uma camada de material selador temporário e resina composta.

4.3.2 Abscesso Periapical

Após a realização de complementação da anestesia local por bloqueio regional e desinfecção da mucosa oral adjacente ao dente com digluconato de clorexidina 2%, o exsudato do abscesso foi coletado através de aspiração utilizando uma seringa esterilizada. A punção foi realizada no momento que precedeu a execução do tratamento do abscesso, que constitui na realização de drenagem cirúrgica, envolvendo incisão com lâmina de bisturi, divulsão dos tecidos e ordenha manual da coleção purulenta e instalação de um dreno cirúrgico. Uma alíquota de 100µL do exsudato foi transferida para um Eppendorf contendo 900 µL de VMGA III.

4.3.3 Prescrição de Agentes Antimicrobianos

Os pacientes que apresentavam abscesso periapical agudo e edema difuso receberam medicação antimicrobiana 30 minutos antes da realização do procedimento de drenagem cirúrgica. Foi fornecido ao paciente Amoxicilina 1g ou Clindamicina 300mg quando o paciente relatou episódio prévio de alergia a antibióticos beta-lactâmicos. Após o tratamento, prescreveu-se amoxicilina 500mg,

de 8 em 8 horas, e dipirona 500mg, de 6 em 6 horas, como medicação pós-operatória, durante 3 dias.

4.3.4 Acompanhamento dos Pacientes

Os pacientes foram monitorados após 24 e 72 horas para observação da resolução do quadro de dor e infecção, para avaliação da necessidade de manutenção ou não da terapia antimicrobiana e também para a remoção do dreno cirúrgico.

Transcorrido o período de 7 dias e observando-se a ausência de sintomatologia dolorosa, os canais foram reinstrumentados e obturados através da técnica de condensação lateral e compressão vertical com condensadores aquecidos. O procedimento restaurador de cada dente foi realizado com a colocação de 2mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) na embocadura dos canais radiculares, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Singlebond (3M Dental Products, St Paul, Estados Unidos) e aplicação de camadas de resina fotopolimerizável Z250 (3M Dental Products, St Paul, Estados Unidos).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO CANAL RADICULAR E DO ABSCESSO PERIAPICAL

Após a etapa de coleta das amostras, foram encaminhados para o laboratório dois tubos tipo “Eppendorf” provenientes do mesmo paciente. Um deles era relativo à coleta do canal radicular, contendo 1 mL de VMGA III e cones de papéis, e outro era relativo à coleta do abscesso periapical, contendo 900 µL de

VMGA III e 100 µL de exsudato. Para o método de cultura microbiana, foram subtraídos 50 µL de cada amostra, sendo o restante empregado para as técnicas moleculares de diagnóstico. As amostras iniciais provenientes do canal radicular e do exsudato periapical receberam o mesmo processamento laboratorial para todas as técnicas do estudo.

4.4.1 Método de Cultura Microbiana

Os métodos empregados foram descritos previamente por Gomes *et al.* (1994a,b; 1996; 2004) e Montagner (2009). Na cabine de anaerobiose, o tubo de Eppendorf contendo a amostra inicial foi agitado por 60 segundos no agitador (MA 162 – Marconi, São Paulo, Brasil) para facilitar a dispersão dos microrganismos. Realizou-se diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 utilizando-se Fastidious Anaerobe Broth (FAB – Lab M, Bury, UK). Alíquotas de 50 µL da amostra não diluída e de cada diluição foram plaqueados em placas pré-reduzidas contendo meio Fastidious Anaerobe Agar (FAA – Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado + hemina (1mg/L) + menadiona (1mg/L), e incubadas em câmara de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento (**Apêndice III**). Após, 50 µL de cada diluição foram dispersos em placas pré-reduzidas contendo meio Agar Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) suplementado com sangue de carneiro desfibrinado e incubadas aerobicamente a 37°C por dois dias, para permitir o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos e aeróbios. Diretamente dos tubos de Eppendorf contendo VMGA III com as amostras do canal radicular, foram retirados 100 µL da amostra e inoculados em placas contendo meios seletivos m-Enterococcus (Difco BD, Sparks, EUA), McConkey Agar (Difco BD, Sparks, MD, EUA), Sabouraud Dextrose Agar (Difco BD, Sparks, MD, EUA), Mitis-Salivarius Agar (Difco BD, Sparks, MD, EUA).

Os períodos e as condições de incubação para cada meio são descritos abaixo:

- FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado + hemina (1mg/L) + vitamina K (1mg/L), incubados a 37°C em câmara de anaerobiose por 2, 7 e 14 dias;
- BHI (Difco BD, Sparks, MD, EUA) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, incubados em estufa microbiológica a 37°C, por dois dias para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos;
- Ágar m-Enterococcus (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) para o isolamento de enterococos, incubadas em aerobiose a 37°C por 2 dias;
- Ágar McConkey (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) para o isolamento de enterobactérias, incubadas em aerobiose a 37°C por 2 dias;
- Ágar Sabouroud Dextrose (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA), para a seleção de fungos e leveduras, incubadas aerobicamente a 26°C por 48 horas e a 37°C por mais 7 dias; e,
- Agar Mitis-Salivarius (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA), para a seleção de *Streptococcus* spp.

Após a incubação, cada placa foi examinada e os diferentes tipos de colônia foram subcultivados em placas de FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado + hemina (1mg/L) + vitamina K (1mg/L) recém-preparados.

O número de unidades formadoras de colônia (UFCs) foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas de FAA de canais radiculares e abscessos periapicais. Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 200.000 ou 20.000.000 o número de UFCs observadas na contagem das placas, dependendo da diluição realizada. A escolha da placa para contagem de UFCs

estava relacionada à possibilidade de contar de forma individual o número de UFCs presentes, geralmente visualizado nas diluições 10^{-4} ou 10^{-6} . Ou seja, quando a diluição 10^{-4} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 10.000 vezes menor que o inicial (1,0 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1,0 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 200.000. Entretanto, quando a diluição 10^{-6} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 1.000.000 vezes menor que o inicial (1,0 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1,0 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 20.000.000.

A seleção das colônias para identificação inicial foi realizada a partir das diferentes aparências no ágar, o que é facilitado pela adição do sangue. O reconhecimento morfológico das colônias foi feito de acordo com o tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no ágar e efeito no sangue (nenhum, hemólise parcial, hemólise completa). As colônias foram isoladas em duas placas recém-preparadas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado + hemina (1mg/L) + vitamina K (1mg/L) com o objetivo de determinar os requerimentos gasosos, sendo uma das placas incubada por 2 dias em estufa microbiológica e a outra por 3 a 5 dias em câmara de anaerobiose. Estas placas foram comparadas para determinar se os isolados eram anaeróbios facultativos ou estritos. No segundo isolamento, somente as espécies que cresceram em anaerobiose foram incubadas em estufa de CO₂. Caso não houvesse crescimento, estas seriam consideradas anaeróbias estritas (**Figura 1**). A morfologia bacteriana foi confirmada após cada incubação através da coloração de Gram (**Figura 2, Apêndice IV**). Foram realizados então os testes complementares de identificação (**Apêndices V a VIII**).

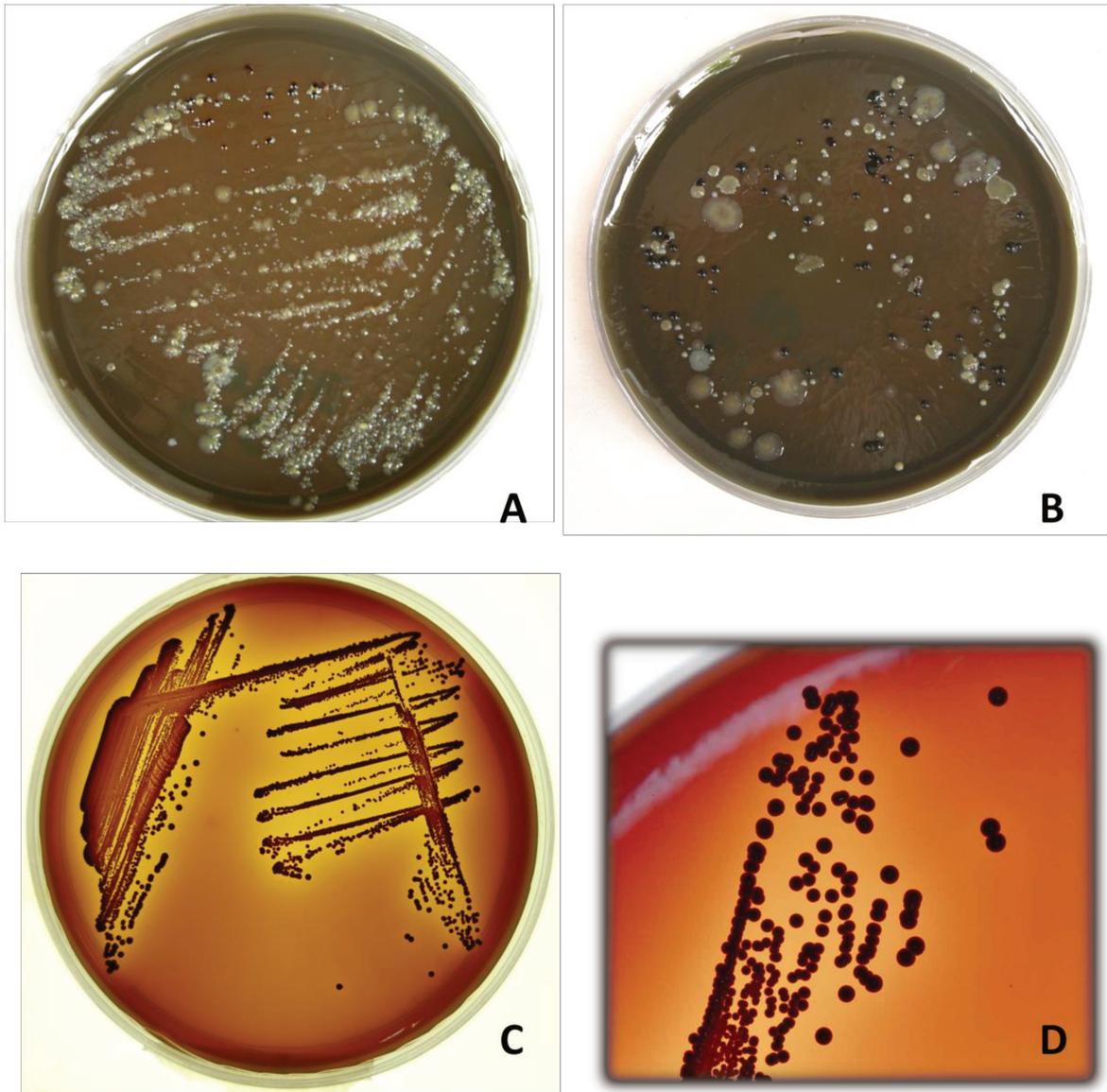


Figura 1 – Isolamento bacteriano: A) Cultura Primária: Placa de FAA contendo inóculo não-diluído, após 10 dias de incubação em cabine de anaerobiose. B) Cultura Primária: placa contendo inóculo diluído em 100 vezes. C) Cultura pura de *P. intermedia/nigrescens*. D) Detalhe da morfologia macroscópica das colônias de *P. intermedia/nigrescens*.

O teste de fluorescência em luz ultravioleta foi realizado a fim de identificar presuntivamente as espécies de *Porphyromonas*, *Prevotella* pigmentadas, diferenciando-as de outros microrganismos não-pigmentados, em fase inicial de crescimento, ou seja de não-pigmentação, através da reação de coloração obtida a partir da fluorescência (**Figura 3, Apêndice VII**). Podem ser obtidos como resultados desse teste:

- *Porphyromonas asaccharolytica* ou *Porphyromonas endodontalis* – vermelho ou laranja;
- *Porphyromonas gingivalis* – não fluorescente;
- *Prevotella* spp. pigmentadas – vermelho;
- Bacilo Gram-negativo não-pigmentado – não fluorescente, rosa ou laranja, amarelo;
- *Fusobacterium* spp – verde;
- *Veillonella* spp – vermelho;
- *Eubacterium lentum* – vermelho não-fluorescente;
- *Clostridium difficile* e *Clostridium innocuum* – verde.

O teste da catalase foi realizado utilizando água oxigenada 15% para diferenciar cocos Gram-positivos aeróbios em *Staphylococcus* spp. (positivos para o teste) e *Streptococcus* spp. (negativos para o teste) (**Apêndice V**).

O teste da oxidase foi realizado para diferenciar bacilos Gram-negativos em fermentadores de glicose e não-fermentadores, sendo positivo para os segundos (**Anexo VI**). A prova é importante na identificação de espécies pertencentes à *Enterobacteriaceae* (todas negativas) de bactérias como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* e *Pasteurella* (todas positivas)

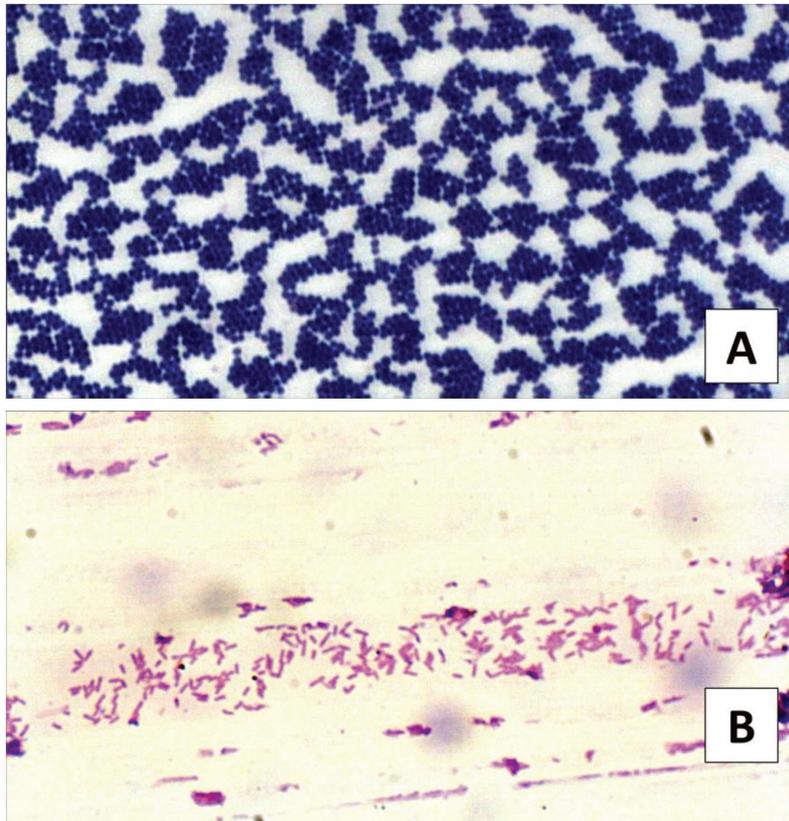


Figura 2 – Coloração de Gram (aumento x100): A) Coco Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*); B) Coco-bacilo Gram-negativo (*Prevotella intermedia/nigrescens*).

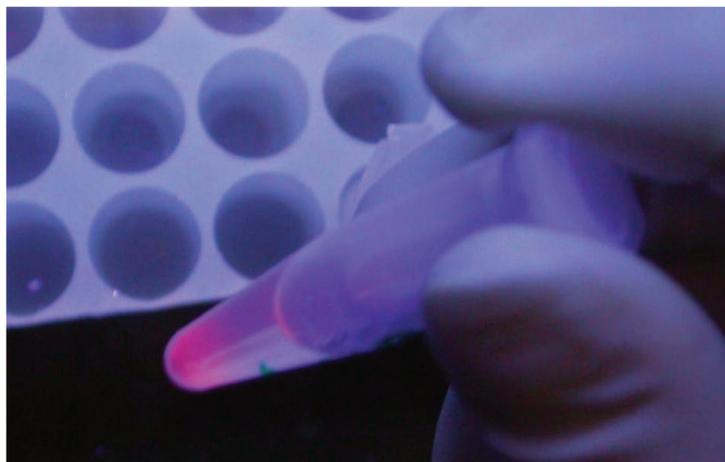


Figura 3 – Teste complementar de fluorescência sob luz UV.

Após a realização dos testes complementares, kits de identificação foram selecionados para a especificação primária dos organismos isolados, conforme descrito nos **Apêndices VIII e IX**. Os kits bioquímicos empregados foram:

- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os bastonetes Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios;
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estafilococos e micrococcos (coccos Gram-positivos, catalase positiva);
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (coccos Gram-positivos, catalase negativa);
- Api Candida (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França), para fungos e leveduras;
- RapID NH System (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França), para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus*; e,
- Api 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França), para *Enterobacteriaceae*.

4.4.2 Extração do DNA Microbiano

Para a execução das técnicas de Análise do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento Terminal de Restrição (T-RFLP), PCR e Nested PCR é necessária a extração do DNA Microbiano contido nas amostras coletadas dos canais radiculares e abscessos periapicais.

Empregou-se o conjunto para extração de DNA de amostras contendo microrganismos e tecidos QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Valencia, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante (**Apêndice X**). As amostras iniciais foram divididas em três alíquotas de 300 µL, e cada uma das alíquotas foi

submetida individualmente aos procedimentos de extração de DNA bacteriano. Em cada amostra, foram adicionados 180 μL do tampão ATL e 20 μL da solução de Proteinase K. Em seguida os tubos foram agitados por 1 minuto e incubados em banho d'água a 56°C, por 30 minutos. Adicionou-se então 200 μL do tampão AL, procedeu-se nova agitação por 1 minuto e os tubos foram expostos à temperatura de 70°C por 10 minutos em banho d'água.

Para a remoção de impurezas e constituintes lipídicos, adicionou-se 200 μL de etanol. Todo o conteúdo do tubo foi transferido para as colunas de purificação contendo microfiltro de sílica, fornecidas pelo fabricante. As colunas foram centrifugadas a 8000 rpm em ultracentrífugas por 1 minuto. O conteúdo líquido no tubo de coleta da parte inferior da coluna foi removido. Este conteúdo correspondia a debris celulares microbianos e componentes do meio de transporte VMGA III. O DNA microbiano permaneceu aderido ao filtro de sílica para lavagens adicionais com tampões. Adicionou-se 500 μL da solução de lavagem AW1, e executou-se centrifugação a 8000 rpm, por 1 minuto. O tampão de lavagem AW2 é adicionado à parte superior do filtro e o mesmo foi novamente centrifugado (13000 rpm, 3 minutos). A eluição do DNA do microfiltro foi obtida através da adição de 100 μL do tampão AE, que foi mantido em contato com o mesmo por 3 minutos, antes da centrifugação final a 8000 rpm, por 1 minuto, quando se obteve o DNA microbiano purificado. As etapas acima descritas encontram-se ilustradas na **Figura 4**.

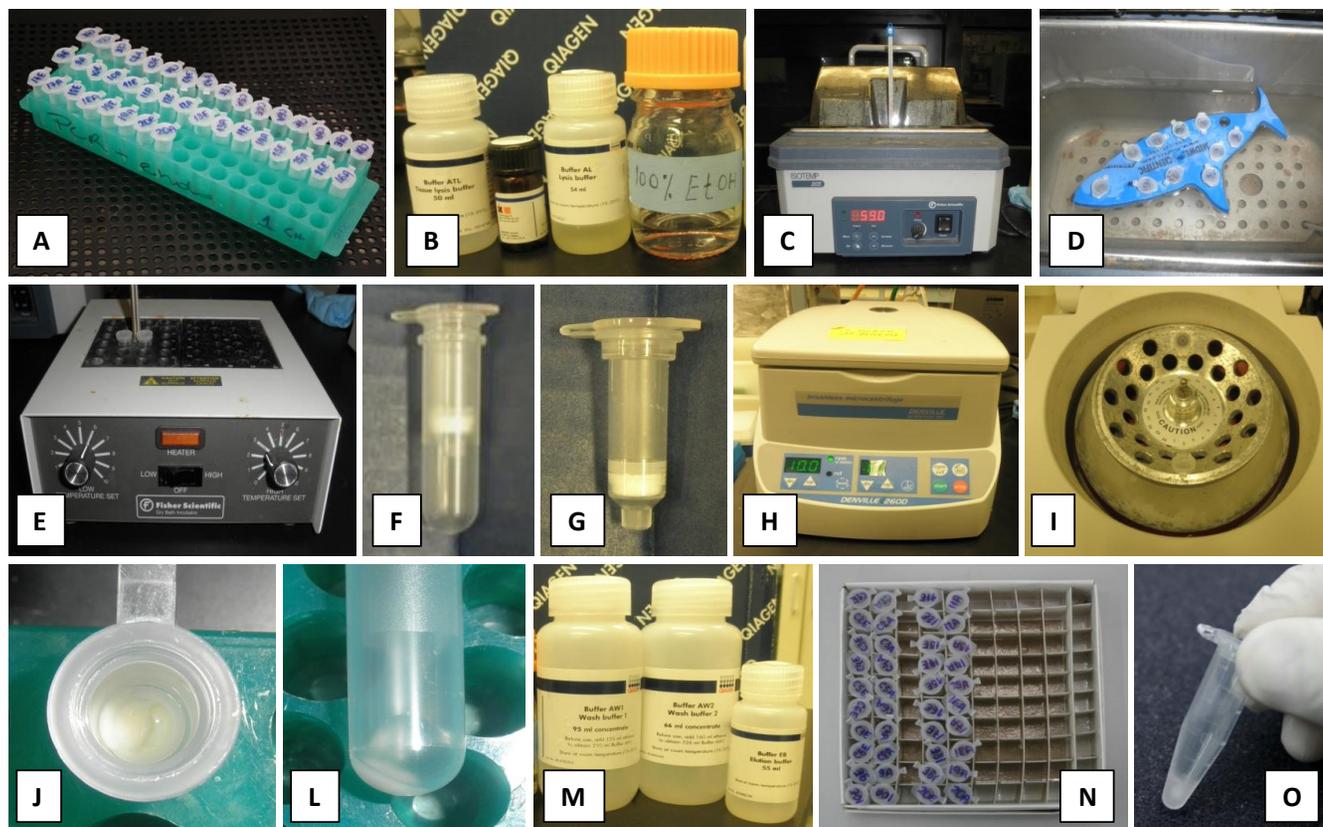


Figura 4 – Extração do DNA microbiano: A) Amostras clínicas; B) Componentes para lise celular do conjunto para Extração de DNA Quiagen®; C) Primeira incubação a 56°C em banho d'água; D) Amostras em banho d'água (2 horas); E) Segunda incubação (70°C, 10 min); F) Coluna para extração de DNA; G) Filtro contendo membrana de sílica para retenção do DNA; H) Centrifuga para remoção de líquidos e lavagem; I) Amostras posicionadas na centrífuga; J) Interior da coluna, contendo resíduos celulares e DNA; L) Resíduos celulares coletados para descarte; M) Soluções para lavagem e purificação do DNA extraído; N) Eluição do DNA em tubos; O) DNA extraído, suspenso em solução tampão.

4.4.3 Análise do Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição – (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A técnica de análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição é uma técnica de ampla detecção empregada para a determinação do número e diversidade de espécies presentes nas amostras.

Os métodos empregados foram descritos previamente por Fullmer *et al.* (2009). Realizou-se uma reação de PCR utilizando-se o DNA microbiano extraído empregando-se os *primers* A18 marcado com hexaclorofluoresceína (5'-TTTGATCCTGGCTCAG-HEX-3') e 317 marcado com carboxifluoresceína (5'-FAM-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') específicos para a amplificação do gene 16S rRNA, ambos fornecidos por Applied Biosystems (Foster City, Califórnia, EUA).

Foram empregadas as condições necessárias para a reação de PCR conforme descrito por Kumar *et al.* (2005). O volume final da reação foi de 50 µL e continha: 27 µL de água ultrapura, 5 µL de tampão para reação de PCR (10x PCR Buffer, Foster City, California, EUA), 6 µL de uma solução de cloreto de magnésio 25mM (Foster City, California, EUA), 5 µL de uma solução de deoxirribonucleotídeos 2mM (Foster City, Califórnia, EUA), 1,25 µL do primer A18 (0,012 µg/ µL), 1,25 µL do primer 317 (0,012 µg/µL), 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Foster City, Califórnia, EUA) e 4 µL do DNA microbiano extraído. As temperaturas e etapas da reação de PCR compreenderam 22 ciclos de desnaturação (95°C, 1min), anelamento (52°C, 2 minutos) e extensão (72°C, 3 minutos), seguidos de uma elongação final (72°C, 10 minutos), processadas em um termociclador (Perkin-Elmer Cetus, Waltham, Massachusetts, EUA).

O produto da reação de PCR foi então purificado através do conjunto Qiaquick (Qiagen, Valência, Califórnia, EUA), conforme recomendações do fabricante. O produto da reação (50 µL) foi misturado a 250 µL de tampão PB e então colocado em uma coluna que contém um filtro de sílica. Após centrifugação

por 1 minuto a 10000 rpm em ultracentrífuga, o conteúdo líquido da coluna foi removido, permanecendo apenas o produto da reação aderido ao filtro de sílica. Adicionou-se então 750 µL da solução de lavagem PE no interior da coluna, seguido de nova centrifugação a 10000 rpm por 3 minutos. Para a remoção do produto da reação purificado, adicionou-se no centro da coluna, sobre o filtro, 50 µL do tampão de eluição EB. A coluna foi reposicionada em um tubo novo, e o conjunto foi centrifugado a 10000 rpm durante 1 minuto.

O produto da etapa de purificação foi submetido à digestão enzimática com as enzimas *HhaI* e *MspI* (New England BioLabs, Ipswich, Maryland, EUA). A enzima *HhaI* é capaz de reconhecer sítios específicos, contendo as seqüências de bases nitrogenadas 5'...GCG[↓]C...3' ou 3'...C[↓]GCG...5', clivando-as (local indicado pelas setas). A enzima *MspI* reconhece e cliva os sítios 5'...C[↓]CGG...3' e 3'...GGC[↓]C...5', conforme indicado pelas setas. Para a reação de digestão, empregou-se 10 µL do produto da reação de PCR purificado, 2 µL do tampão 1x NE Buffer (New England Biolabs, Ipswich, Maryland, EUA), 1 µL da enzima *HhaI* ou *MspI* e 7 µL de água ultrapura. Todos os procedimentos foram realizados com imersão dos frascos em gelo, para evitar degradação enzimática. A placa contendo 40 reações para a enzima *HhaI* e as 40 reações para a enzima *MspI* foi selada e incubada a 37°C em estufa microbiológica por 3 horas. A partir da reação de digestão, foram produzidos fragmentos de ácidos nucléicos contendo os fluoróforos, que foram analisados através de seqüenciamento e determinação da intensidade de fluorescência.

Uma quantidade de 10 µL do produto da digestão enzimática foi purificado através do conjunto AMPure beads (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, Maryland, EUA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. 5 µL do produto purificado foi desnaturado com 10 µL de formamida deionizada e misturado a 0,2 µL do padrão de comprimento GeneScan 1200 LIZ (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), para fragmentos de ácidos nucléicos que contém entre 20 bp e 1200 bp. O comprimento dos fragmentos foi determinado através do equipamento AB3730 DNA Analyzer, conforme o padrão

GeneScan. O número, o comprimento e a área de cada pico foram determinados através do software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As etapas da técnica da análise do polimorfismo de fragmentos terminais de restrição está ilustrada na **Figura 5**.

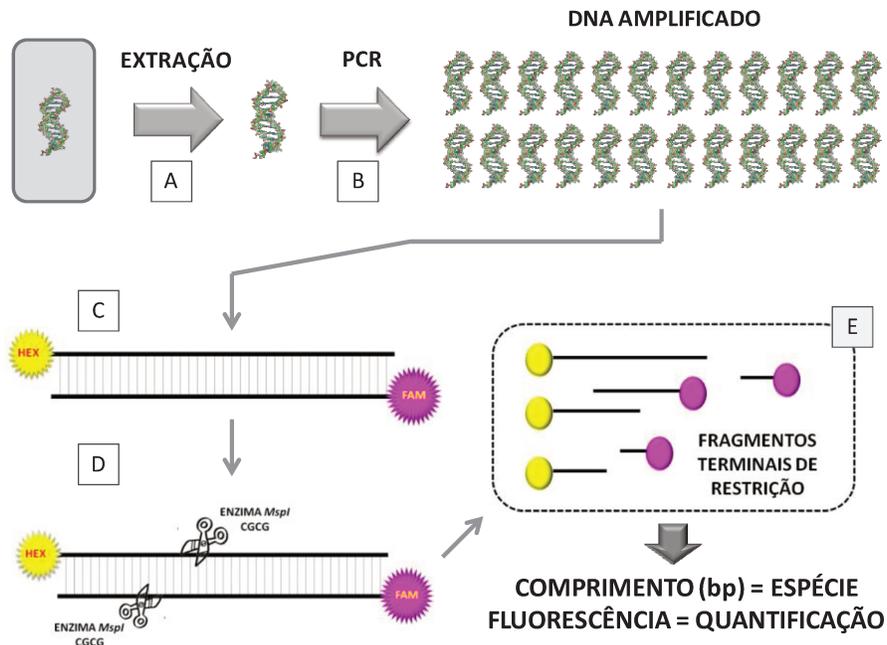


Figura 5 – Etapas da Técnica de TRFLP: A) Extração do DNA microbiano. B) Reação de PCR com *primers* contendo moléculas fluorescentes. C) Fragmento de DNA bacteriano amplificado com fluoróforos. D) Digestão dos fragmentos com enzimas de restrição. E) Fragmentos terminais, produtos da reação de digestão.

4.4.4 Técnica de PCR

A técnica de PCR foi empregada para a detecção das espécies *Enterococcus faecalis*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae* e *Tannerella forsythia*, nas

amostras provenientes de canais radiculares e abscessos periapicais (**Apêndice XI**), de acordo com o descrito por Berber (2009). Foram empregados *primers* espécie-específicos, direcionados à região do gene 16S rRNA no DNA bacteriano. As seqüências dos oligonucleotídeos foram obtidas a partir de referências na literatura.

As reações de PCR foram processadas na quantidade total de 25 µL para cada amostra e continham 2,5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,5 µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de solução de cloreto de magnésio (MgCl₂, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,75 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,75 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 17,625 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,125 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 1,5 µL de DNA extraído da amostra clínica.

As etapas do ciclo de PCR compreenderam uma desnaturação inicial (95°C, 2 min); 36 ciclos de desnaturação (94°C, 30 seg), anelamento (temperatura específica para cada conjunto de primers, 1 min) e extensão (72°C, 2 min); seguidos de uma extensão final (72°C, 10 minutos). As temperaturas de anelamento foram determinadas a partir da utilização dos primers específicos e de DNA bacteriano proveniente de cepas padrão ATCC, que foram submetidos a um gradiente de temperaturas em termociclador (MJ 96 G, Byocycler Termocicladores, Curitiba, Paraná, Brasil) e também baseadas na literatura de suporte.

As seqüências dos nucleotídeos, as temperaturas específicas da etapa de anelamento, o comprimento do fragmento amplificado e a citação bibliográfica referente a cada primer estão listadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Seqüências, temperatura de anelamento, comprimento do fragmento e referência para os nucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

| Espécie | Seqüência | T. de Anelamento (°C) | Fragmento | Referência |
|------------------------|--|-----------------------|-----------|---------------------------------|
| <i>E. faecalis</i> | 5' CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G 3' 5' CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC 3' | 68 | 138 bp | Sedgley <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>F. alocis</i> | 5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3' | 60 | 594 bp | Siqueira <i>et al.</i> , 2003g. |
| <i>P. micra</i> | 5'AGA GTT TGA ATC CTG GCT CAG 3' 5'ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC 3' | 60 | 207 bp | Conrads <i>et al.</i> , 1997. |
| <i>P. endodontalis</i> | 5' GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC 3' 5' CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC 3' | 58 | 672 bp | Siqueira <i>et al.</i> , 2001b. |
| <i>P. gingivalis</i> | 5' AGG CAG CTT GCC TAG AGT CGG 3' 5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT | 58 | 404 bp | Roças <i>et al.</i> , 2002a. |
| <i>P. intermedia</i> | 5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3' | 58 | 575 bp | Slots <i>et al.</i> , 1995. |
| <i>P. nigrescens</i> | 5' ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG 3' 5' CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A 3' | 58 | 804 bp | Bogen & Slots, 1999. |
| <i>P. tanneriae</i> | 5' CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG 3' 5' CAG CTG ACT TAT ACT CCC G 3' | 55 | 550 bp | Xia <i>et al.</i> , 2000. |
| <i>T. forsythia</i> | 5' TGC TTC AGT AGT TAT ACC T 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3' | 56 | 641 bp | Slots <i>et al.</i> , 1995. |

Alíquotas do DNA bacteriano extraído a partir das cepas ATCC e também alíquotas da água ultrapura foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente. As etapas anteriormente descritas encontram-se ilustradas na **Figura 6**.

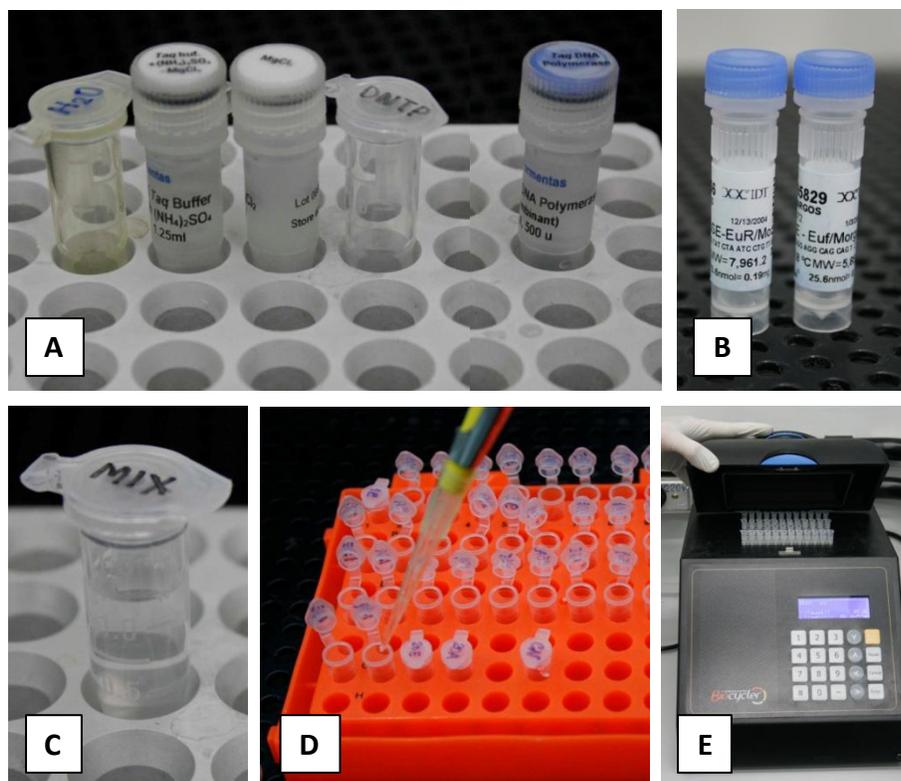


Figura 6 – Preparo da reação de PCR: A) Reagentes empregados para a mistura da PCR: água milli-Q, tampão para enzima Taq DNA Polymerase, Cloreto de Magnésio, solução contendo dNTPs, enzima Taq DNA Polymerase. B) *Primers* empregados na reação. C) Mistura para reação de PCR. D) Distribuição da mistura para a reação de PCR nos microtubos contendo as amostras. E) Termociclador.

A presença de amplicons específicos em cada amostra para as seqüências estudadas foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) em tampão Trisborato EDTA 10x diluído (pH 8,0) e corados com brometo de etídeo (5 µg/mL, Invitrogen, Brasil). Para cada gel, foi adicionado um marcador de peso molecular de 100 bp (DNA Ladder, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil). As condições para eletroforese foram 120 V, durante 45 minutos. Após este período, os géis corados em brometo de etídeo foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. A documentação fotográfica foi obtida através do equipamento Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). A captura das imagens foi realizada através do programa LISCAP Image Capture, fornecido pelo mesmo fabricante. Reações positivas foram determinadas através da presença de bandas que apresentavam o comprimento apropriado, de acordo com a **Tabela 5**. As etapas acima descritas encontram-se ilustradas na **Figura 7**.

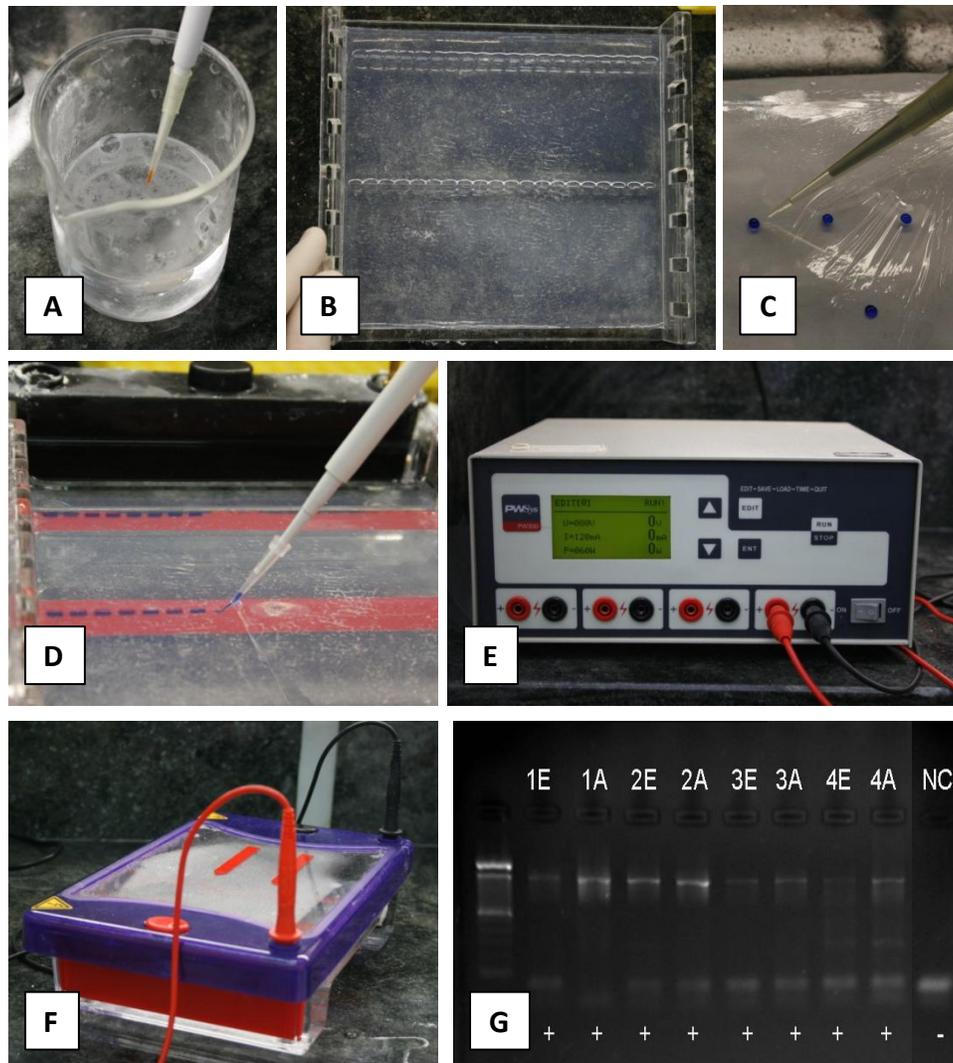


Figura 7 – Visualização do produto da PCR: A) Adição de Brometo de etídeo à agarose. B) Agarose solidificada. C) Mistura do produto de reação ao corante. D) Inserção das amostras nos poços do gel de agarose. E) Fonte de eletroforese. F) Cubra de eletroforese. G) Visualização do gel e detecção da presença (bandas) ou ausência da espécie microbiana nas amostras de canal radicular (E) ou abscesso periapical (A).

4.4.5. Técnica de Nested-PCR

A técnica de Nested-PCR foi empregada para a detecção de espécies do gênero *Treponemas* e do microrganismo *Enterococcus faecalis*. Foram estudadas as espécies *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium*, *Treponema pectinovorum*, *Treponema socranskii* e *Treponema vincentii*. As condições da reação de PCR bem como as seqüências de nucleotídeos empregadas nas reações de amplificação foram descritas previamente por Willis *et al.* (1999).

A primeira reação empregou o *primer* universal direcionado à amplificação do gene 16S rRNA em sua totalidade, sendo inespecífico para uma determinada espécie bacteriana. Na segunda reação empregou-se 1,5 µL do produto da reação anterior e os primers específicos para cada espécie, que continham seqüências de nucleotídeos presentes no fragmento anteriormente amplificado. Para ambas as etapas, o volume total da reação foi de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,5 µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (dNTPs, (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de solução de cloreto de magnésio (MgCl₂, (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,75 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,75 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 17,625 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,125 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 1,5 µL da amostra clínica (para a primeira reação) ou do produto da amplificação com o primer 16S rRNA (para a segunda reação).

As temperaturas e os tempos empregados na reação de PCR foram: Desnaturação inicial (97°C, 1 minuto); 26 ciclos, compreendendo as etapas de desnaturação (97°C, 45 segundos), anelamento (temperatura específica para cada

conjunto de primer, 45 segundos) e alongamento (72°C, 1 minuto); e, alongamento final (72°C, 4 minutos).

A **Tabela 6** demonstra a seqüência dos primers empregados, as temperaturas de anelamento, a região do gene 16S rRNA a ser amplificado e o comprimento do fragmento gerado após a reação de PCR.

A presença de amplicons específicos em cada amostra para as seqüências estudadas foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, conforme descrito em detalhes no item 4.4.4.

Tabela 6 - Espécies microbianas, primers, posição do gene 16S rRNA de ligação do primer, comprimento do fragmento amplificado e temperatura de anelamento referentes aos nucleotídeos utilizados nas reações de Nested-PCR.

| Microrganismos | Primers (5' → 3') | Posição | Fragmento | Anelamento |
|-------------------------------|--|---------|-----------|------------|
| Universal 16S ribosomal DNA | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACTT | 8–1.513 | 1505 bp | 55°C |
| <i>Treponema denticola</i> | TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA | 193–508 | 316 bp | 60°C |
| <i>Treponema amylovorum</i> | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTCACGCCTTTATTCCGTGAG | 8–211 | 193 bp | 54°C |
| <i>Treponema maltophilum</i> | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CCTATTGTGCTTATTCATCAGGC | 8–446 | 438 bp | 54°C |
| <i>Treponema medium</i> | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CCTTATGAAGCACTGAGTGTATTC | 8–200 | 192 bp | 54°C |
| <i>Treponema socranskii</i> | GATCACTGTATACGGAAGGTAGACA TACACTTATTCCTCGGACAG | 179–468 | 285 bp | 53°C |
| <i>Treponema pectinovorum</i> | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ATATATCTCCAATTATATGACCT | 8–205 | 194 bp | 53°C |
| <i>Treponema vincentii</i> | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AATACTTCTTATGAACATTGAGAC | 8–201 | 193 bp | 56°C |

Para a detecção do microrganismo *Enterococcus faecalis*, foi utilizada a metodologia descrita por Gomes *et al.* (2006) para as reações de Nested-PCR.

O DNA isolado das amostras clínicas foi inicialmente amplificado com o conjunto de primers universais para os genes 16S e 23S rRNA 785 e 422 respectivamente. Esta amplificação inclui a região intergênica da região 16S do DNA ribossomal, o que permite uma verificação adicional da especificidade dos primers, uma vez que o comprimento desta região é variável entre as espécies. As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50 µL, contendo 5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, Brasil); 1,0 µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 2,5 µL de solução de cloreto de magnésio (MgCl₂, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,5 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,5 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 35,25 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 3 µL da amostra clínica. Para controle positivo foi empregado uma alíquota de DNA extraído de cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) e como controle negativo, foi utilizada apenas a solução da reação de PCR sem DNA bacteriano. As amostras foram submetidas a 22 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 42°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 3 minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos em termociclador (MJ 96 G, Byocycler Termocicladores, Curitiba, PR, Brasil).

A presença de *E. faecalis* foi determinada através de uma segunda reação com primer espécie-específico para o gene 16S rRNA e também um primer universal, L189, complementar ao gene 23S. As concentrações e volumes dos reagentes foram similares às descritas para a primeira reação de amplificação. No entanto, foi adicionado à mistura, 3 µL do produto da primeira reação como alvo. Foram realizados então 27 ciclos que compreendiam desnaturação a 94°C por 1 minuto, 52°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos. Da mesma forma, foram

empregados os controles positivos e negativos, com o objetivo de excluir presença de contaminação entre as reações.

Da mesma forma, a presença de amplicons específicos em cada amostra para as seqüências estudadas foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, conforme descrito em detalhes no item 4.4.4.

A **Tabela 7** demonstra a região de ligação, a seqüência e a direção de síntese de cada um dos primers empregados nesta etapa.

Tabela 7 – Região de ligação, especificidade, direção de síntese e seqüência dos *primers* empregados para a detecção de *E. faecalis* através de Nested-PCR.

| Primers | Especificidade | Direção | Seqüência |
|---------|------------------------|-------------|-------------------------|
| 422 | Universal 23S | 422 bp → 5' | GGAGTATTTAGCTT |
| Sm785 | Universal 16S | 785 bp → 5' | GGATTAGATACCCTGGTAGTC |
| ENFE | <i>E. faecalis</i> 16S | 5' → 3' | GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGA |
| L189 | Universal 23S | 5' → 3' | GGTACTTABATGTTTCAGTTC |

4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DOS CANAIS RADICULARES – E-TEST

As bactérias anaeróbias estritas do grupo dos *Peptostreptococcus* (cocos Gram-positivos); as bactérias produtoras de pigmento negro do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella*, (bastonetes Gram-negativos anaeróbios estritos); cepas de *Fusobacterium nucleatum* (bastonetes Gram-negativos anaeróbios estritos); os anaeróbios estritos Gram-positivos *Gemella morbillorum* e *Propionibacterium propionicum* tiveram sua suscetibilidade antimicrobiana testada através do método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia). Os agentes antimicrobianos testados foram: Benzilpenicilina (PG), Amoxicilina (AC), Amoxicilina + ácido clavulânico (XL), Clindamicina (CM), Eritromicina (EM), Metronidazol (MZ) e Azitromicina (AZ).

Para preparar o inóculo, após 24-48 h de incubação da espécie bacteriana em placas de FAA (Fastidious Anaerobe Agar) + sangue desfibrinado de carneiro, as colônias bacterianas foram transferidas para o meio líquido “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB) e agitadas, para atingir a turbidez que equivale ao padrão 1 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil) para bactérias anaeróbias estritas, que foi verificado no espectrofotômetro (MARCONI, São Paulo, SP, Brasil).

Placas contendo 4 mm de espessura de Brucella Agar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 1% de vitamina K + 0,5% de hemina (para bactérias anaeróbias estritas) foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de *swab* esterilizado, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test, que haviam sido previamente removidas do congelador e já se encontravam a temperatura ambiente cerca de 20 minutos, foram distribuídas nas placas com o auxílio de pinça esterilizado para cada substância a ser testada. O experimento foi executado em duplicata e sempre em fluxo laminar.

As placas contendo as bactérias anaeróbias estritas foram imediatamente incubadas em uma câmara de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂, e a leitura realizada após 24 e 48 h de incubação. Os valores das CIM foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento (**Figura 8**). O valor de CIM₅₀ e CIM₉₀ correspondem às concentrações inibitórias mínimas para 50% e 90% dos isolados, respectivamente. De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Valores interpretativos dos pontos de corte para determinação da suscetibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos testados de acordo com a metodologia estabelecida.

| AGENTE ANTIMICROBIANO | CIM (µg/mL) | | | REFERÊNCIA |
|---------------------------------|-------------|----|-----|--------------------------------------|
| | S* | I* | R* | |
| Penicilina G | ≤0.5 | 1 | ≥2 | CLSI 2007 |
| Amoxicilina | ≤4 | 8 | ≥16 | CLSI 2007 |
| Amoxicilina + Ácido Clavulânico | ≤2 | 4 | ≥8 | CLSI 2007 |
| Clindamicina | ≤2 | 4 | ≥8 | CLSI 2007 |
| Metronidazol | ≤8 | 16 | ≥32 | CLSI 2007 |
| Azitromicina | ≤2 | - | - | van Winkelhoff <i>et al.</i> , 2005. |
| Eritromicina | 4 | - | - | van Winkelhoff <i>et al.</i> , 2005. |

* S = suscetível, I = intermediário, R = resistente.

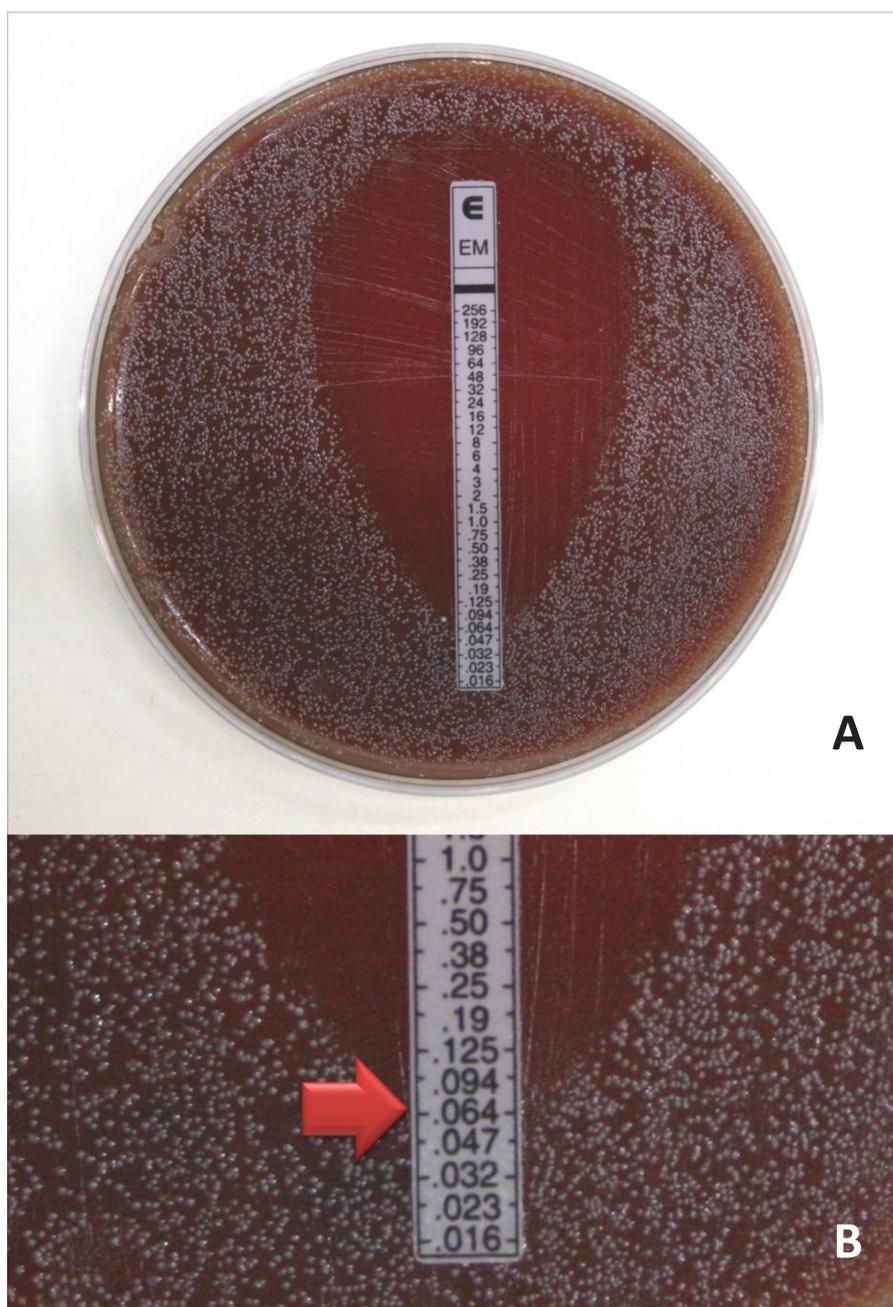


Figura 8 – Suscetibilidade aos antimicrobianos pelo E-test. A) Placa com crescimento bacteriano de *P. intermedia/nigrescens* e fita de eritromicina, após 48 horas de incubação. B) Aumento da figura anterior, mostrando o ponto de intersecção (seta) entre o halo de inibição bacteriana e a fita de E-test.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Características das Comunidades Microbianas através de TRFLP

Os dados do comprimento e a área dos picos relativos aos fragmentos de restrição gerados foram dispostos em uma planilha de cálculo (Microsoft Office Excell 2007, Microsoft Corporation, Redmont, Washington, EUA) e processados. Fragmentos com comprimento de picos inferior a 50 unidades fluorescentes foram excluídos da análise. As áreas dos picos de fluorescência foram padronizadas através da razão entre o valor unitário de cada pico e o total obtido para a amostra, gerando um valor percentual (Rees *et al.*, 2004). Picos que apresentavam menos que 1% da área total foram designados como zero, e as porcentagens dos picos remanescentes foram recalculadas. A média do número e área dos picos gerados pelo conjunto enzima *MspI* e fluoróforo HEX ou FAM foi computada para cada amostra, e a partir deles foi gerado o índice de diversidade de Shannon-Wiener. Determinou-se também o número de FTR compartilhados entre amostras pareadas.

A similaridade dos perfis das comunidades microbianas para os pares de amostras de canal radicular e abscesso periapical foi verificada através do número de fragmentos terminais de restrição compartilhados e pelo índice de similaridade de Bray-Curtis. Para esta análise, empregou-se o programa EstimateS 8.2.0 (University of Connecticut, Storrs, CT, EUA).

O Teste de Wilcoxon foi utilizado para testar a hipótese nula de que não há diferença entre o número de espécies ou a diversidade das comunidades microbianas em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais.

4.6.2 Análise da presença de espécies microbianas em Canais Radiculares e Abscessos periapicais através Cultura Microbiana, PCR e Nested-PCR

Os dados coletados foram colocados em uma planilha de cálculo (Microsoft Office Excell 2007, Microsoft Corporation, EUA) e estatisticamente analisados utilizando-se os programas SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Para todos os testes estatísticos empregados, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

A frequência da presença das espécies isoladas através do método de cultura microbiana ou detectadas através de PCR e *Nested-PCR* foi determinada para as amostras de canal radicular e abscesso periapical de um mesmo paciente.

O Teste Exato de Fisher foi empregado para testar a hipótese nula que não há diferença na ocorrência de uma mesma espécie bacteriana em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais.

O Teste de McNemar foi empregado para testar a hipótese nula que não há discordância entre a sensibilidade dos métodos de cultura microbiana e PCR para a detecção de uma mesma espécie nas amostras clínicas.

4.6.3 Similaridade dos perfis de comunidades microbianas através da análise de conglomerados ou agrupamento

A análise de agrupamento é uma técnica multivariada que permite a determinação da semelhança entre grupos de dados, examinando relações de interdependência entre todo o conjunto de variáveis. O agrupamento é feito com base na similaridade ou dissimilaridade dos casos. No presente estudo, o objetivo

da análise foi classificar os objetos em grupos homogêneos, que tentem a ser semelhantes entre si, mas diferentes de outros grupos.

O perfil das comunidades microbianas foi traçado a partir da ausência ou presença de espécies, isoladas/detectadas através dos métodos de cultura microbiana, PCR e Nested-PCR, gerando um cluster representativo para cada amostra.

Os resultados foram representados em um gráfico do tipo dendograma. A leitura do gráfico deve ser feita da direita para a esquerda, considerando-se linhas horizontais que indicam a posição de similaridade entre os grupos e linhas verticais, que conectam apenas amostras similares.

A determinação do grau de similaridade entre amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos foi determinada em uma escala quantitativa, denominada de coeficiente de agrupamento. Este é obtido a partir do cálculo da distância com o método Euclidiano entre os clusters (amostras). Amostras com valores de distâncias zero ou próximo a zero constituem um grupo com alta similaridade e são conectadas apenas através de uma barra vertical, próximo ao zero, na escala do eixo das coordenadas. Estas estão destacadas com áreas hachuradas sobre a denominação da amostra no dendograma. Amostras com distâncias maiores que zero demonstram maiores níveis de dissimilaridade, distanciando-se do ponto zero. A determinação de grupos de amostras similares foi realizada através da divisão dos valores em quartis, sendo as amostras pertencentes ao primeiro quartil consideradas com maior similaridade (menores valores de distância obtida pelo método Euclidiano). Estas foram conectadas por áreas hachuradas no dendograma.

4.6.4 Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos (E-test)

Os microrganismos foram classificados em suscetíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) de acordo com a CIM do agente antimicrobiano testado para a cepa. Os índices de suscetibilidade foram determinados de acordo com as concentrações inibitórias mínimas reportadas por normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2007) e descritas por van Winkenhoff *et al.* (2005). Para a determinação de CIM₅₀ e CIM₉₀, todos os valores de CIM obtidos para cada grupo de microrganismo frente ao mesmo antibiótico foram ordenados do menor ao maior. O valor de CIM₅₀ e CIM₉₀ correspondem às concentrações inibitórias mínimas para 50% e 90% dos isolados, respectivamente. Caso ocorra a presença de um número par de amostras, o valor da CIM₅₀ corresponde à mediana dos valores centrais. O valor de CIM₉₀ corresponde à CIM para 90% dos isolados.

O Teste de Kruskal-Wallis foi empregado para verificar a hipótese nula de que não há diferença estatisticamente significativa entre a efetividade dos agentes antimicrobianos.

O Teste de Wilcoxon foi empregado para verificar a hipótese nula que não há diferença entre a sensibilidade das cepas isoladas de canais radiculares ou abscessos periapicais frente aos agentes antimicrobianos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Foram selecionados 20 pacientes que apresentavam dentes com necrose pulpar e abscesso periapical agudo e edema. A idade média dos indivíduos foi 30,5 anos, variando entre 21 e 62 anos, sendo que 5 deles pertenciam ao gênero masculino e 15 ao gênero feminino.

Nenhum dos pacientes relatou ser portador de diabetes ou outra condição relacionada à imunossupressão. Quando questionados quanto ao hábito de fumar, 15 pacientes relataram não serem fumantes, enquanto que 5 eram fumantes habituais.

Os elementos dentais avaliados pertenciam ao grupo dos incisivos (9/20), caninos (2/20), pré-molares (4/20) e molares (5/20). Clinicamente, 50% estavam restaurados, 35% apresentavam-se com cárie dental e apenas 15% estavam hígidos.

Os vinte pacientes relataram dor espontânea, localizada e contínua no momento do atendimento. Cerca de 45% dos pacientes associaram ocorrência de dor prévia, anterior a este período, no elemento dental em questão. Quando questionados quanto ao tempo de duração da sintomatologia dolorosa, 9/20 relataram que a dor havia surgido no período de até dois dias, em 7/20 o surgimento ocorreu entre 3 e 5 dias, e apenas 4/20 relataram dores há mais de 6 dias. As respostas aos testes de percussão vertical e palpação periapical demonstraram-se positivas em todos os casos. No momento da coleta, 7 canais estavam secos enquanto que 13 apresentavam-se molhados. Destes, observou-se exsudação purulenta (11/13) e sanguinolenta (2/13). Após o acesso endodôntico, verificou-se presença de odor em 65% dos casos.

Em relação à tumefação observada na região periapical, 15 casos apresentavam-se com tumefação localizada e apenas 5 estava difusa. Em relação ao tempo, 40% dos pacientes relataram que o início do edema havia ocorrido há 1 dia, 35% há 2 dias e 25% há mais que 3 dias.

Ao exame radiográfico, observou-se que em 6 casos havia aumento do espaço do ligamento periodontal na região periapical e 14 casos estavam associados com lesão periapical. Os dados encontram-se descritos de forma detalhada para cada indivíduo participante da pesquisa no **Apêndice XII**.

5.2 CARACTERÍSTICAS DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

5.2.1 Análise do Polimorfismo do Comprimento do Fragmento Terminal de Restrição

O número de fragmentos terminais de restrição (FTR) gerados após a digestão com a enzima *MspI*, que corresponde ao número de espécies, diferiu entre os dois marcadores fluorescentes. Para amostras de canais radiculares, 111 FTRs marcados com FAM e 95 FTRs marcados com HEX foram detectados. Considerando a média de ambos fluoróforos, 103 diferentes espécies foram encontradas nas amostras provenientes de canais radiculares. Nas amostras provenientes de abscessos periapicais, um número menor de espécies foi observado para os FTRs marcados com FAM e HEX, com uma média de 75,5 FTRs (84 para FAM e 67 para HEX). Não houve diferença estatisticamente significativa na variedade de espécies observadas em amostras de canais radiculares ou abscessos periapicais (Teste de Wilcoxon, $p > 0.05$).

Nenhum fragmento esteve presente em todas as amostras. Um fragmento marcado com HEX e com comprimento de 274 pares de base esteve

presente em 17 amostras de canais radiculares e 18 amostras de abscessos periapicais. No entanto a grande maioria dos fragmentos esteve presente em apenas uma amostra (49,7% dos fragmentos detectados em canais radiculares e 34,4% dos fragmentos detectados em abscessos periapicais).

O número médio de espécies detectado em cada amostra de canal radicular foi 13,55 ($\pm 6,49$) e em abscesso periapical foi 12,68 ($\pm 7,79$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras (Teste de Wilcoxon, $p=0,7017$). A **Figura 9** demonstra o número de espécies por amostra de canal radicular ou abscesso periapical. As amostras pareadas estão conectadas por linhas.

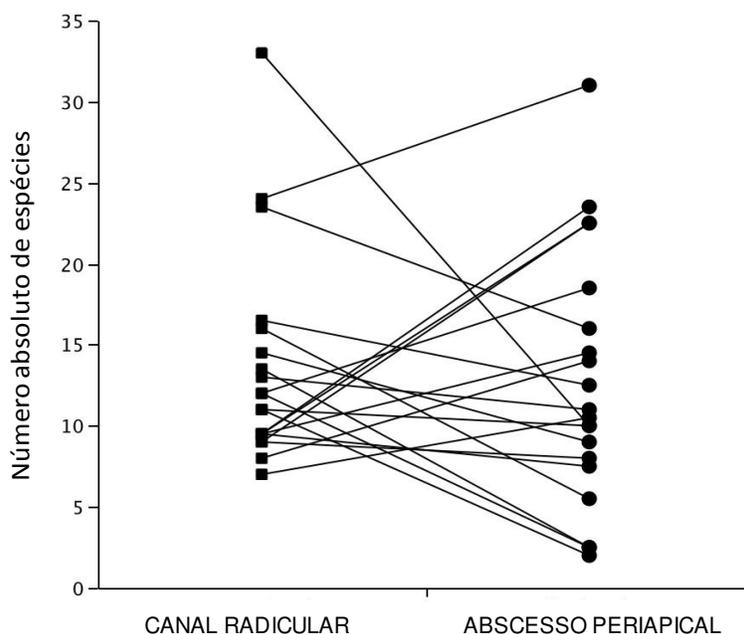


Figura 9 – Número de espécies (fragmentos terminais de restrição) em 20 pares de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais. Os pares de amostras estão conectados por linhas.

Os valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener para as comunidades bacterianas em canais radiculares e abscessos periapicais foram similares e não se observou diferença estatisticamente significativa entre elas (Teste de Wilcoxon, $p=0,9841$). A média do índice para amostras de canais radiculares foi de 2,647 ($\pm 0,506$) e para abscessos periapicais foi de 2,650 ($\pm 0,675$). Os valores individuais de cada amostra estão representados na **Figura 10**, onde amostras pareadas estão conectadas através de linhas.

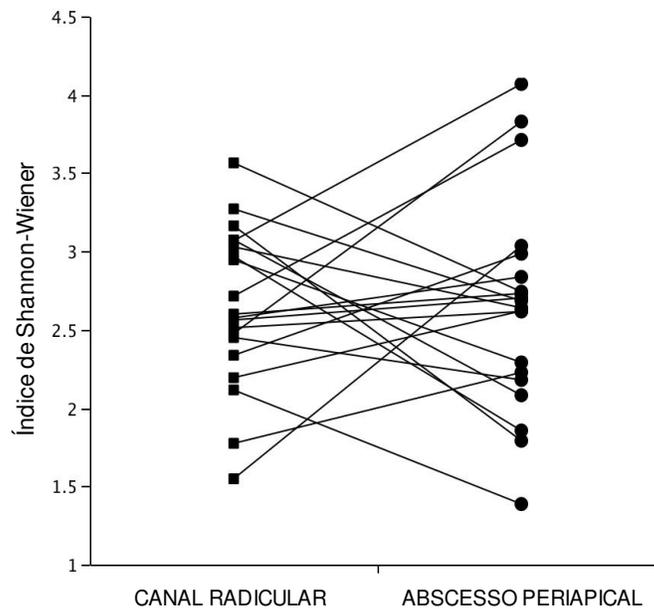


Figura 10 – Índice de diversidade de Shannon-Wiener em 20 pares de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais. Os pares de amostras estão conectados por linhas.

A **Figura 11** demonstra a análise comparativa para o número de espécies e o índice de diversidade de Shannon-Wiener em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais quando foram considerados o hábito de fumar, a presença de dor prévia e as características dos exsudatos durante as coletas.

Observa-se um número maior de espécies microbianas em canais radiculares dos pacientes que relataram dor prévia ($p=0,0156$). Pacientes não-fumantes ou que não relatavam dor prévia apresentaram comunidades microbianas com um índice de diversidade de espécies microbianas superior ($p<0,05$).

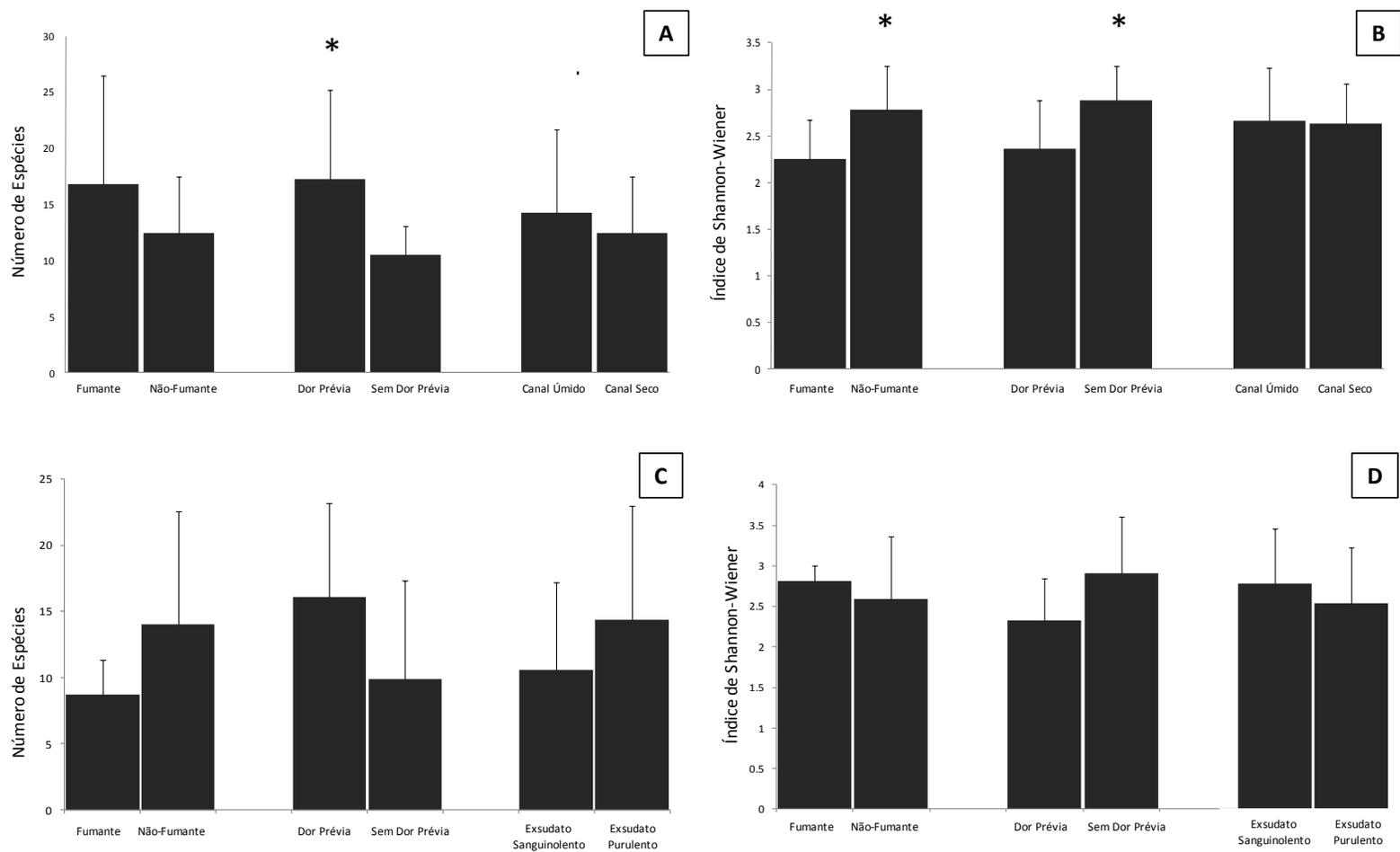


Figura 11 – Distribuição do número de espécies e índice de diversidade em amostras de canais radiculares (A e B) e abscessos periapicais (C e D), considerando o hábito de fumar, presença de dor prévia e características do exsudato durante a coleta

O número médio de espécies bacterianas compartilhadas por amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais foi de 4,3 e 3,15 considerando os fragmentos marcados pelos fluoróforos HEX e FAM (Teste T, $p=0,1753$). A **Figura 12** demonstra o número médio de fragmentos compartilhados em amostras pareadas, considerando os fluoróforos HEX e FAM.

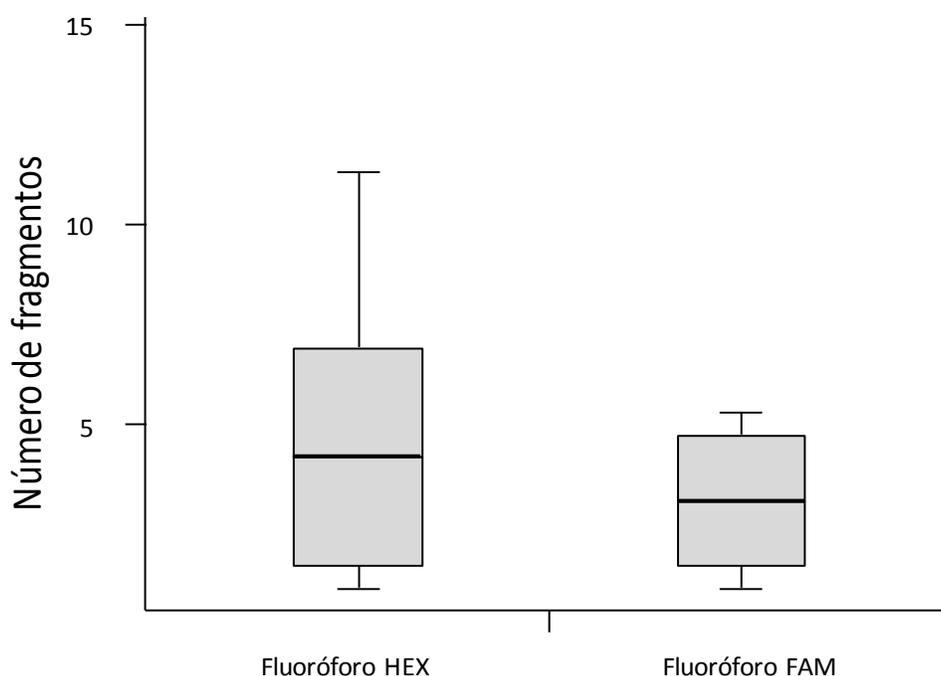


Figura 12 - Média do número de fragmentos compartilhados em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais, de acordo com o fluoróforo empregado.

A **Figura 13** apresenta o número médio de espécies compartilhadas e índice de similaridade de Bray-Curtis em amostras pareadas de canal e abscesso, considerando-se os fatores hábito de fumar e presença de dor prévia. Observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de espécies compartilhadas entre os dois sítios. Entretanto, pacientes fumantes apresentam uma similaridade maior em suas comunidades microbianas que pacientes não-fumantes.

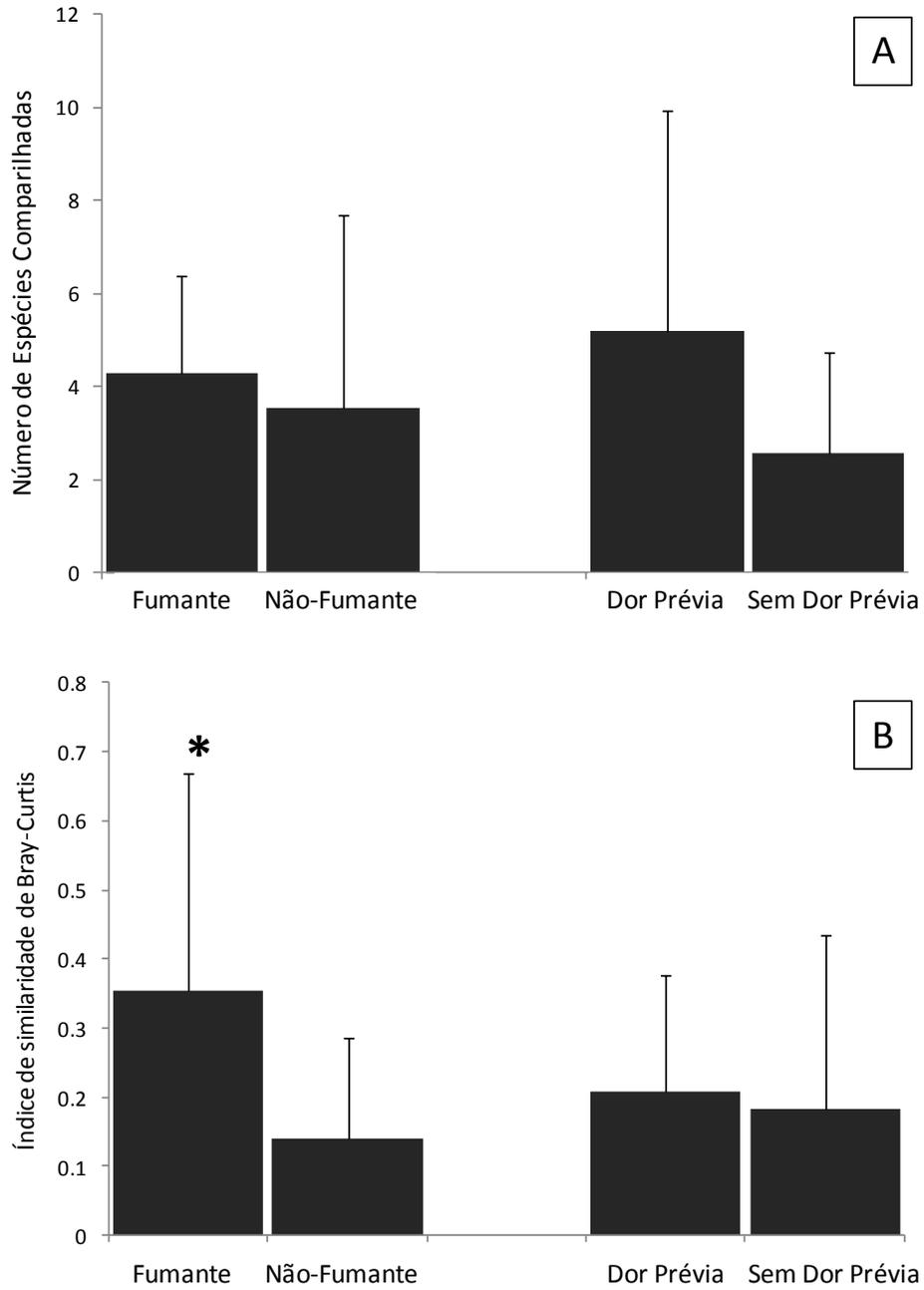


Figura 13 – Número médio de espécies compartilhadas e índice de similaridade de Bray-Curtis em amostras pareadas de canal e abscesso, considerando-se os fatores hábito de fumar e presença de dor prévia (*p<0.05).

5.2.2 Método de Cultura Microbiana

A microbiota de ambos os ecossistemas era composta predominantemente por microrganismos anaeróbios estrictos. Microrganismos anaeróbios facultativos corresponderam a apenas 17,5% e 8,9% dos isolados em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, respectivamente (**Figura 14**).

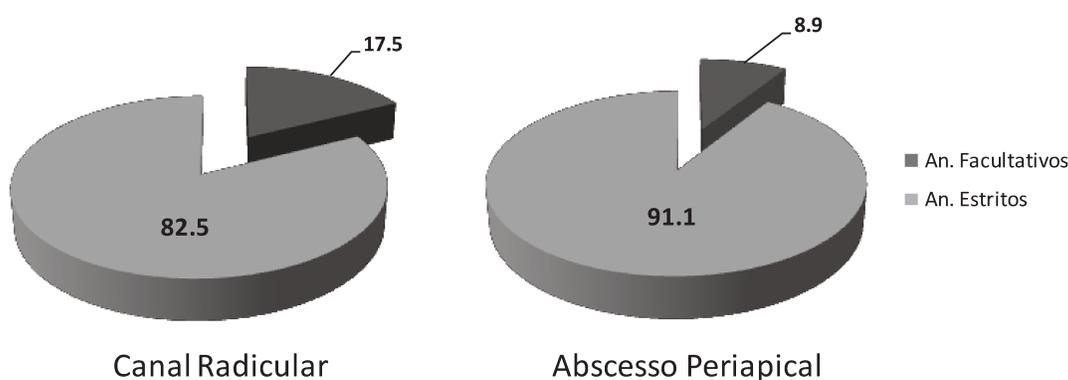


Figura 14 – Proporção de microrganismos anaeróbios estrictos e anaeróbios facultativos isolados em amostras pareadas obtidas de canais radiculares e abscessos periapicais (n=20).

Em amostras de canais radiculares, foram isolados 96 microrganismos pertencentes à 36 espécies sendo enquadrados em 24 gêneros. Dez bactérias foram identificadas apenas pelo seu gênero. Cinquenta e seis microrganismos, pertencentes a 25 espécies e distribuídos em 18 gêneros foram identificados em amostras de abscessos periapicais. Observou-se um predomínio de bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos em comunidades microbianas associadas a canais radiculares e abscessos periapicais (**Figura 15**). O número médio de unidades formadoras de colônias em amostras de canais radiculares foi $5,4 \times 10^5$ UFCs e de abscessos periapicais foi $3,6 \times 10^5$ UFCs ($p > 0,05$; Teste ANOVA).

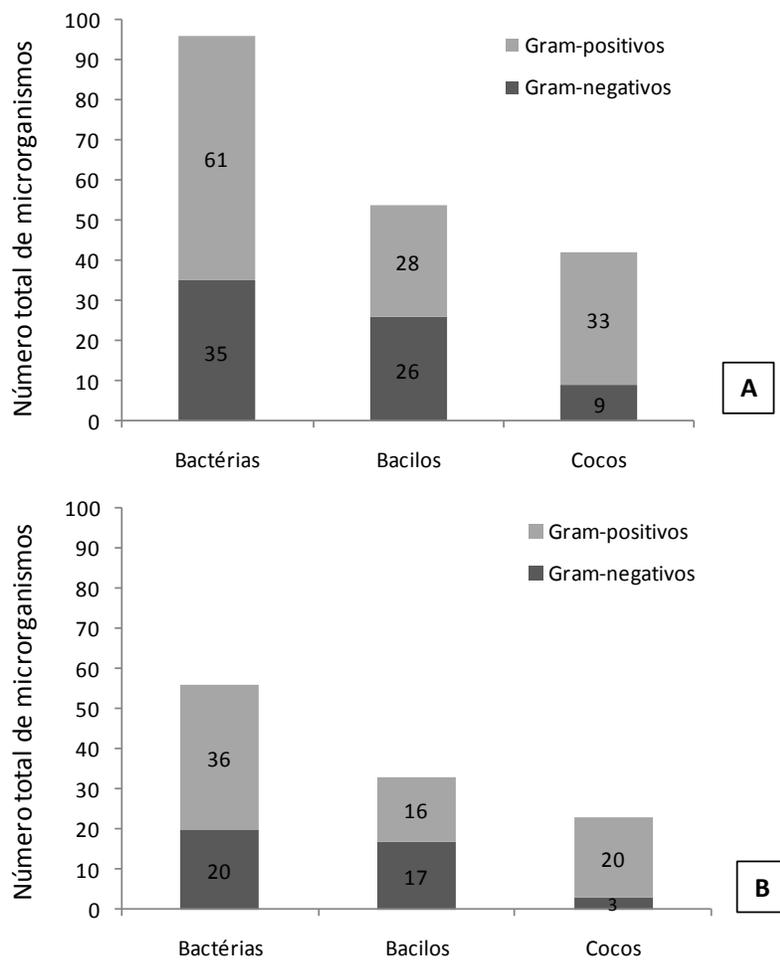


Figura 15 – Frequência de espécies gram-positivas e gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em canais radiculares (A) e abscessos periapicais (B) em amostras pareadas.

A totalidade das amostras obtidas do canal radicular apresentou crescimento microbiano, enquanto que em 6 amostras de abscessos periapicais não foram observadas colônias microbianas (**Figura 16**). Os canais radiculares abrigaram individualmente um máximo de 11 espécies diferentes, com média de 4-6 espécies por canal. O número máximo de espécies isoladas em amostras de abscessos periapicais foi 7, com média de 2 a 5 microrganismos.

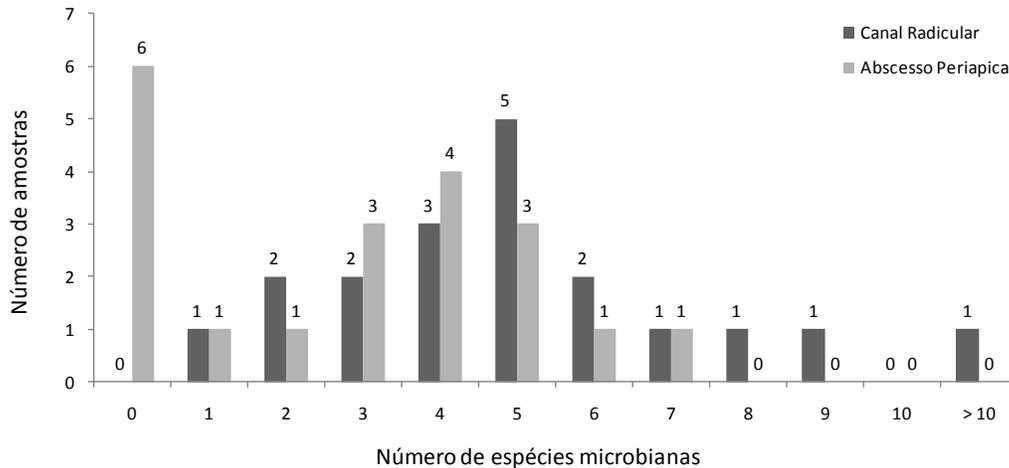


Figura 16 – Distribuição de microrganismos isolados de canais radiculares e abscessos periapicais, considerando o número de espécies e o número de casos clínicos.

As bactérias anaeróbias estavam presentes em 95% dos canais radiculares estudados, e os microrganismos mais freqüentemente isolados *Gemella morbillorum* (n=8), *Parvimonas micra* (n=8), *Prevotella buccae* (n=6), *Bacteroides ureolyticus* (n=5), *Prevotella intermedia/nigrescens* (n=4) e *Prevotella buccae* (n=4) (**Tabelas 9 e 10**). Bactérias anaeróbias facultativas foram encontradas em 45% dos canais, principalmente *Eubacterium limosum* (n=3), *Escherichia coli* (n=2) e *Actinomyces naeslundii* (n=2). *Candida albicans* foi isolada em apenas um canal radicular. A presença simultânea de anaeróbios estritos e facultativos foi observada em 40% das amostras.

Setenta por cento das amostras de abscessos periapicais apresentavam microrganismos anaeróbios estritos enquanto que em 40% delas foram isolados também microrganismos anaeróbios facultativos. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Bacteroides ureolyticus* (n=5), *Parvimonas micra* (n=5), *Propionibacterium acnes* (n=5), *Gemella morbillorum* (n=4) e *Clostridium* spp. (n=4) (**Tabelas 9 e 10**)

Tabela 9 – Frequência de microrganismos anaeróbios estritos isolados em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais agudos.

| Espécie | Canal Radicular | Abscesso | Ambos |
|---|-----------------|----------|-------|
| Bacilos Gram-Negativos | | | |
| <i>Prevotella buccae</i> | 6 | 3 | 1 |
| <i>Prevotella intermedia/nigrescens</i> | 4 | 2 | 0 |
| <i>Prevotella oralis</i> | 4 | 3 | 2 |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 3 | 1 | 0 |
| <i>Prevotella disiens</i> | 3 | 2 | 0 |
| <i>Prevotella</i> spp. | 2 | 0 | 0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Fusobacterium varium</i> | 0 | 1 | 0 |
| <i>Prevotella loescheii</i> | 0 | 1 | 0 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 0 | 1 | 0 |
| Bacilos Gram-Positivos | | | |
| <i>Bacteroides ureolyticus</i> | 5 | 5 | 2 |
| <i>Clostridium bifidum</i> | 3 | 0 | 0 |
| <i>Actinomyces odontolyticus</i> | 2 | 0 | 0 |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 2 | 1 | 1 |
| <i>Clostridium tyrobutiricum</i> | 2 | 2 | 1 |
| <i>Bacteroides capillosus</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | 1 | 0 | 0 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Clostridium</i> spp. | 1 | 4 | 0 |
| <i>Clostridium acetobutyricum</i> | 1 | 1 | 0 |
| <i>Clostridium difficile</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Clostridium tetanii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Egghertella lenta</i> | 1 | 0 | 0 |
| Cocos Gram-Negativos | | | |
| <i>Capnocytophaga</i> spp. | 2 | 1 | 1 |
| <i>Veillonella</i> spp. | 2 | 0 | 0 |
| <i>Neisseria</i> spp. | 2 | 0 | 0 |
| Cocos Gram-Positivos | | | |
| <i>Gemella morbillorum</i> | 8 | 4 | 0 |
| <i>Parvimonas micra</i> | 8 | 5 | 2 |
| <i>Anaerococcus prevotii</i> | 4 | 3 | 0 |
| <i>Finegoldia magna</i> | 4 | 0 | 0 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | 4 | 5 | 1 |
| <i>Propionibacterium propionicum</i> | 2 | 0 | 0 |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | 1 | 1 | 0 |

Tabela 10 – Freqüência de microrganismos anaeróbios facultativos e fungo isolados em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais agudos.

| Espécie | Canal Radicular | Abscesso Periapical | Ambos |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------|-------|
| Bacilos Gram-Negativos | | | |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Pasteurella pneumotropica</i> | 0 | 1 | 0 |
| Bacilos Gram-Positivos | | | |
| <i>Eubacterium limosum</i> | 3 | 1 | 1 |
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | 2 | 2 | 1 |
| <i>Listeria</i> spp. | 0 | 1 | 0 |
| Cocos Gram-Negativos | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 2 | 0 | 0 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 | 2 | 0 |
| Cocos Gram-Positivos | | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Staphylococcus lentus</i> | 0 | 1 | 0 |
| Fungo | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 1 | 0 | 0 |

Onze espécies foram isoladas simultaneamente em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais. *P. oralis*, *P. micra* e *B. ureolyticus* foram detectadas simultaneamente em dois pacientes cada. Os anaeróbios estritos *P. buccae*, *C. botulinum*, *C. tyrobutyricum*, *Capnocytophaga* spp., *P. acnes* e os facultativos *E. limosum*, *A. naeslundii* e *S. epidermidis* foram detectados simultaneamente em apenas 1 paciente cada.

Não foram observadas associações estatisticamente significantes entre espécies e sinais e sintomas relacionados à presença de abscesso periapical.

5.3 DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS ESTRITOS E *Enterococcus faecalis* ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES

5.3.1 PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Todas as amostras demonstraram apresentar DNA bacteriano quando o primer universal direcionado ao gene 16S rRNA foi empregado.

Dentre os primers específicos utilizados, as espécies mais freqüentemente detectadas em canais radiculares através do método de PCR foram *P. endodontalis* (11/20), *P. nigrescens* (8/20), *F. alocis* (7/20), *T. forsythia* (7/20) e *P. micra* (5/20). *Enterococcus faecalis* esteve presente em apenas uma amostra de canal radicular. As espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella tanneriae* não foram detectadas nas amostras.

As espécies mais freqüentemente detectadas nos exsudatos coletados de abscessos periapicais foram *P. endodontalis* (9/20), *P. nigrescens* (9/20), *F. alocis* (7/20), *P. tanneriae* (6/20) e *T. forsythia* (6/20). *Enterococcus faecalis* foi detectado em apenas uma amostra, enquanto que *F. nucleatum* não esteve presente em nenhuma amostra.

A espécie *Prevotella tanneriae* foi mais freqüentemente encontrada em amostras de abscessos periapicais que em amostras de canais radiculares (Teste de McNemar, $p=0,0313$).

A presença concomitante de espécies microbianas em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais de um mesmo paciente ocorreu para as espécies *P. nigrescens* (5/20), *P. endodontalis* (4/20), *F. alocis* (3/20), *T. forsythia* (2/20), *P. micra* (2/20) e *P. gingivalis* (1/20).

A **Tabela 11**. demonstra a freqüência de detecção das 10 espécies estudadas através do método de PCR em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais.

Tabela 11 – Freqüência de espécies microbianas detectadas em amostras pareadas de canais radiculares (n=20) e abscessos periapicais agudos (n=20), através do método de PCR.

| Espécie | Canal Radicular | Abscesso Periapical | Ambos |
|-----------------------------------|-----------------|---------------------|-------|
| <i>Porphyromonas endodontalis</i> | 11 | 9 | 4 |
| <i>Prevotella nigrescens</i> | 8 | 9 | 5 |
| <i>Filifactor alocis</i> | 7 | 7 | 3 |
| <i>Tannerella forsythia</i> | 7 | 6 | 2 |
| <i>Parvimonas micra</i> | 5 | 7 | 2 |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 3 | 3 | 1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 0 | 4 | 0 |
| <i>Prevotella tannerae</i> * | 0 | 6 | 0 |

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$, Teste Exato de Fisher).

5.3.2 TÉCNICA DE *NESTED-PCR* PARA A DETECÇÃO DE *Treponema* spp. E *Enterococcus faecalis*

Todas as amostras foram positivas para a presença de DNA bacteriano conforme observado no produto da primeira reação.

Treponema spp. estiveram presentes em 18 amostras de canais radiculares e 19 amostras de exsudatos periapicais. As espécies mais freqüentemente detectadas foram *T. socranskii* (CR=17/20; AP=15/20), *T. denticola* (CR=8/20; AP=11/20), seguidos de *T. medium* (CR=6/20; AP=9/20) e *T. amylovorum* (CR=5/20; AP=9/20). *T. pectinovorum* não foi detectado em nenhuma amostra. A **Tabela 12** demonstra o número de *Treponemas* spp. isolados em canais radiculares e exsudatos periapicais, e a ocorrência de uma mesma espécie simultaneamente nas amostras pareadas de um mesmo paciente. Mais de uma espécie foi detectada em 9 canais radiculares e 15 amostras de exsudato periapical.

A espécie *Enterococcus faecalis* foi detectada em apenas uma amostra de canais radiculares e não foi detectada em amostras de abscessos periapicais.

Tabela 12 – Freqüência de espécies microbianas detectadas em amostras pareadas de canais radiculares (n=20) e abscessos periapicais agudos (n=20), através do método de *Nested-PCR*.

| Espécie | Canal Radicular | Abscesso Periapical | Ambos |
|------------------------|-----------------|---------------------|-------|
| <i>T. socranskii</i> | 17 | 15 | 12 |
| <i>T. denticola</i> | 9 | 11 | 7 |
| <i>T. médium</i> | 6 | 8 | 5 |
| <i>T. vincentii</i> | 6 | 5 | 3 |
| <i>T. amylovorum</i> | 5 | 9 | 4 |
| <i>T. maltophilum</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>T. pectinovorum</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | 0 | 0 |

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Teste de Fisher).

O **Apêndice XIII** ilustra as características das comunidades e distribuição dos microrganismos em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, considerando as técnicas de análise do polimorfismo do comprimento do fragmento terminal de restrição, cultura microbiana, PCR e Nested-PCR.

5.3.3 Comparação da Sensibilidade das Técnicas de Cultura Microbiana e PCR

A técnica de PCR demonstrou ser mais sensível para a detecção de microrganismos que a técnica da cultura microbiana. O Teste de McNemar foi empregado para comparar a sensibilidade das técnicas de cultura microbiana e PCR. Em amostras de canais radiculares, a técnica do PCR demonstrou ser mais sensível na detecção de *P. endodontalis* ($p=0,0006$). Em amostras de abscessos periapicais, a técnica do PCR também demonstrou ser mais sensível que a técnica de cultura microbiana para *P. endodontalis* ($p=0,006$), *P. nigrescens* ($p=0,0155$), *F. alocis* ($p=0,0025$), *T. forsythia* ($p=0,0101$) e *P. tanneriae* ($p=0,0101$). Um baixo índice de concordância na detecção das espécies foi observado para as técnicas de cultura microbiana e PCR. Os dados estão representados na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Freqüência e detecção simultânea de espécies microbianas em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos, através dos métodos de Cultura e PCR.

| Espécie | Canal Radicular (n=20) | | | Abscesso Periapical (n=20) | | |
|-----------------------------------|------------------------|-----|-------|----------------------------|-----|-------|
| | Cultura | PCR | Ambos | Cultura | PCR | Ambos |
| <i>P. endodontalis</i> | 1 | 11* | 1 | 0 | 9* | 0 |
| <i>P. nigrescens</i> ¹ | 4 | 8 | 2 | 2 | 9* | 1 |
| <i>F. alocis</i> | 0 | 7 | 0 | 0 | 7* | 0 |
| <i>T. forsythia</i> | 0 | 7 | 0 | 0 | 6* | 0 |
| <i>P. micra</i> | 8 | 5 | 1 | 5 | 7 | 3 |
| <i>P. gingivalis</i> | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| <i>E. faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>F. nucleatum</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. intermedia</i> ¹ | 4 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 |
| <i>P. tanneriae</i> ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 | 6* | 0 |

¹ As espécies *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. tanneriae* não podem ser diferenciadas através do método de caracterização bioquímica Rapid ID32A.

* Diferença estatisticamente significativa (Teste de McNemar, $p < 0,05$).

5.4 SIMILARIDADE DAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE CANAIS RADICULARES E ABSCESSOS PERIAPICAIS IDENTIFICADAS ATRAVÉS DOS MÉTODOS DE CULTURA MICROBIANA E MOLECULARES PELA ANÁLISE DE CLUSTERS

As **Figuras 17** e **18** demonstram o nível de agrupamento das comunidades microbianas de canais radiculares e abscessos periapicais determinadas através do método de cultura. Dentre as 20 amostras de canais radiculares, 8 constituíram um grande agrupamento e duas um pequeno agrupamento (**Fig. 17**). Nas amostras de abscessos periapicais agudos, um grande agrupamento foi observado para 9 amostras. A maioria das amostras apresentou acentuado grau de dissimilaridade. As amostras AP-1, AP-3, AP-6,

AP-7, AP-9 e AP-10 constituíram um grupamento altamente relacionado, considerando-se os valores obtidos para as distâncias Euclidianas (**Fig. 18**).

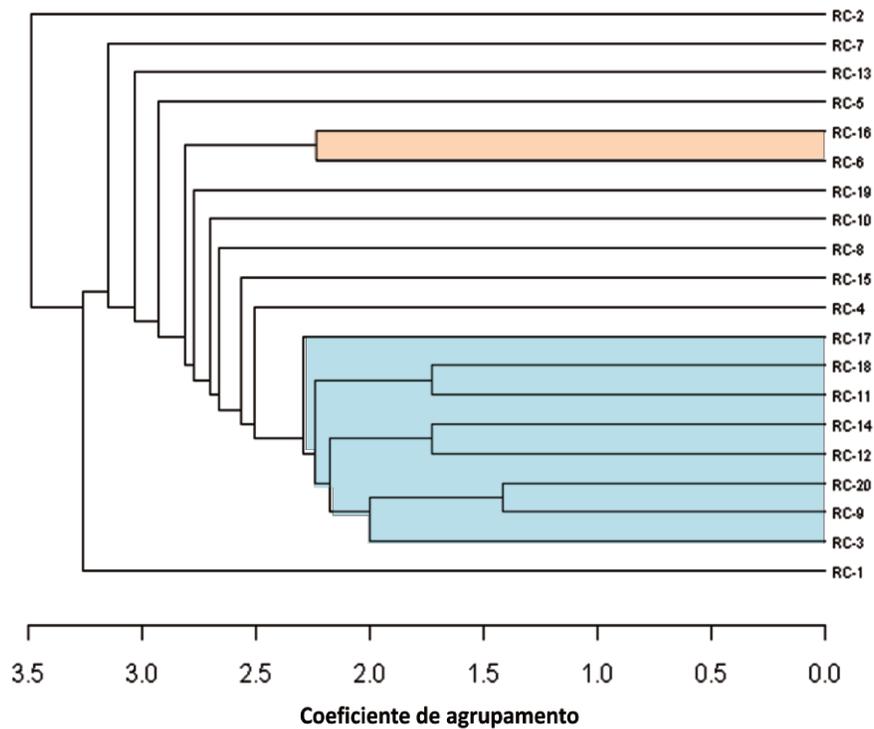


Figura 17 – Dendrograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas através do método de cultura em amostras de canais radiculares (CR). Áreas hachuradas de mesma cor, no interior do gráfico, indicam formação de grupos.

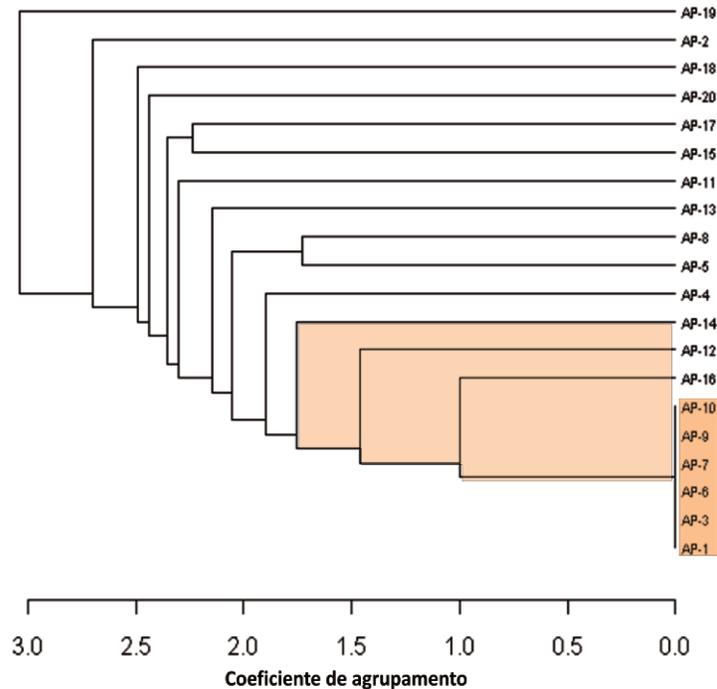


Figura 18 – Dendrograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas através do método de cultura em amostras de abscessos periapicais (AP) agudos. Áreas hachuradas de mesma cor, no interior do gráfico, indicam formação de grupos.

As **Figuras 19** e **20** demonstram dendogramas obtidos a partir da análise de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, respectivamente, através dos métodos de PCR e Nested-PCR. Em amostras de canais radiculares, observou-se acentuada similaridade entre duplas de amostras, não formando grandes aglomerados. Observa-se um perfil bastante heterogêneo para as comunidades que integram as amostras, de acordo com a distância calculada pelo método Euclidiano (**Fig. 19**). As comunidades microbianas em abscessos periapicais demonstraram distribuição em 1 grande cluster de amostras (onde dois grupos apresentaram alta similaridade) e em um pequeno cluster, constituído pelas amostras AP-2 e AP-3 (**Fig. 20**).

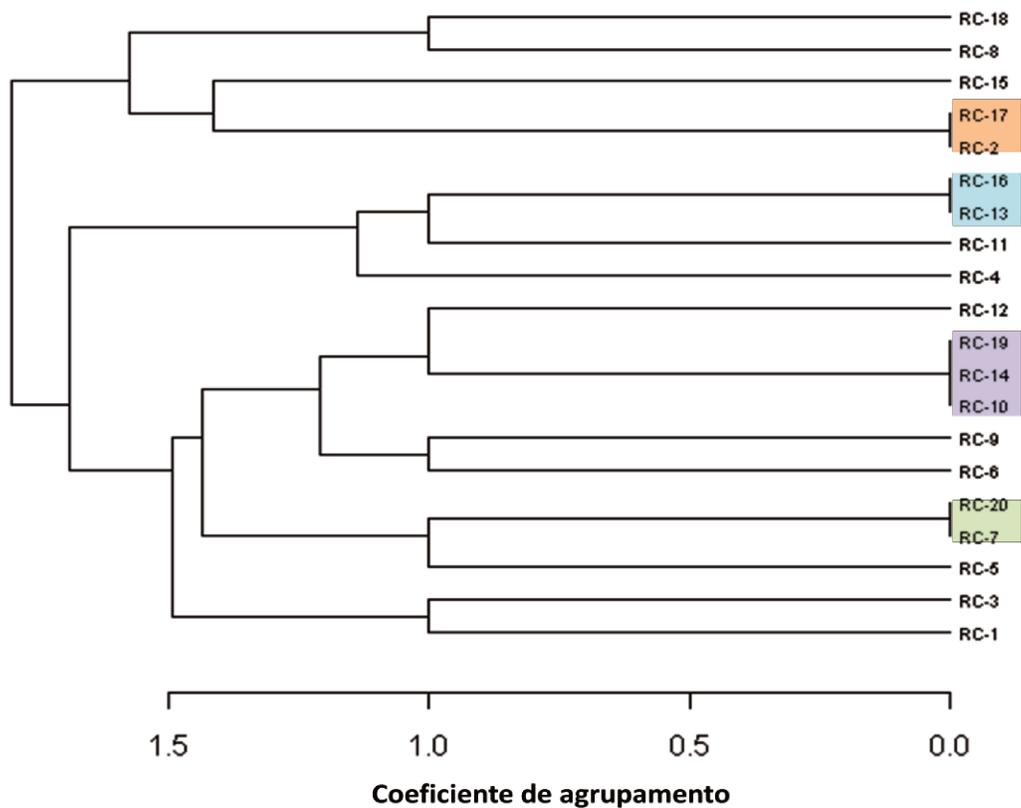


Figura 19 – Dendrograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas através dos métodos de PCR e Nested-PCR em amostras de canais radiculares (CR), considerando as espécies selecionadas. Áreas hachuradas de mesma cor, sobre os códigos das amostras, demonstram alta similaridade entre as mesmas.

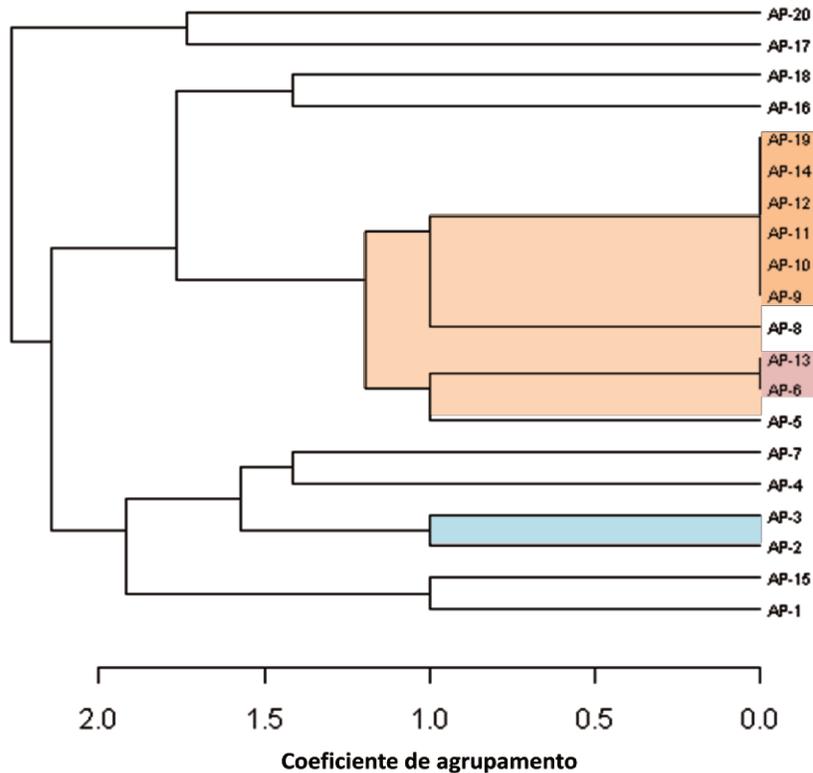


Figura 20 – Dendrograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas detectadas através dos métodos de PCR e Nested-PCR em amostras de abscessos periapicais agudos. Áreas hachuradas de mesma cor, no interior do gráfico, indicam formação de grupos. Áreas hachuradas de mesma cor, sobre os códigos das amostras, demonstram alta similaridade entre as mesmas.

A **Figura 21** apresenta os agrupamentos para amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, considerando-se as comunidades microbianas determinadas através dos métodos de cultura microbiana, PCR e Nested-PCR. Apenas o par AP-9 e AP-10 demonstrou formar agrupamento em todas as técnicas de avaliação utilizadas. Mesmo não havendo um nível de agrupamento alto entre os clusters, obteve-se uma interpretação satisfatória do dendrograma, devido à nítida distinção entre os grupos formados. Pode-se observar uma heterogeneidade na composição das comunidades microbianas em infecções relacionadas de um mesmo indivíduo e entre os indivíduos.

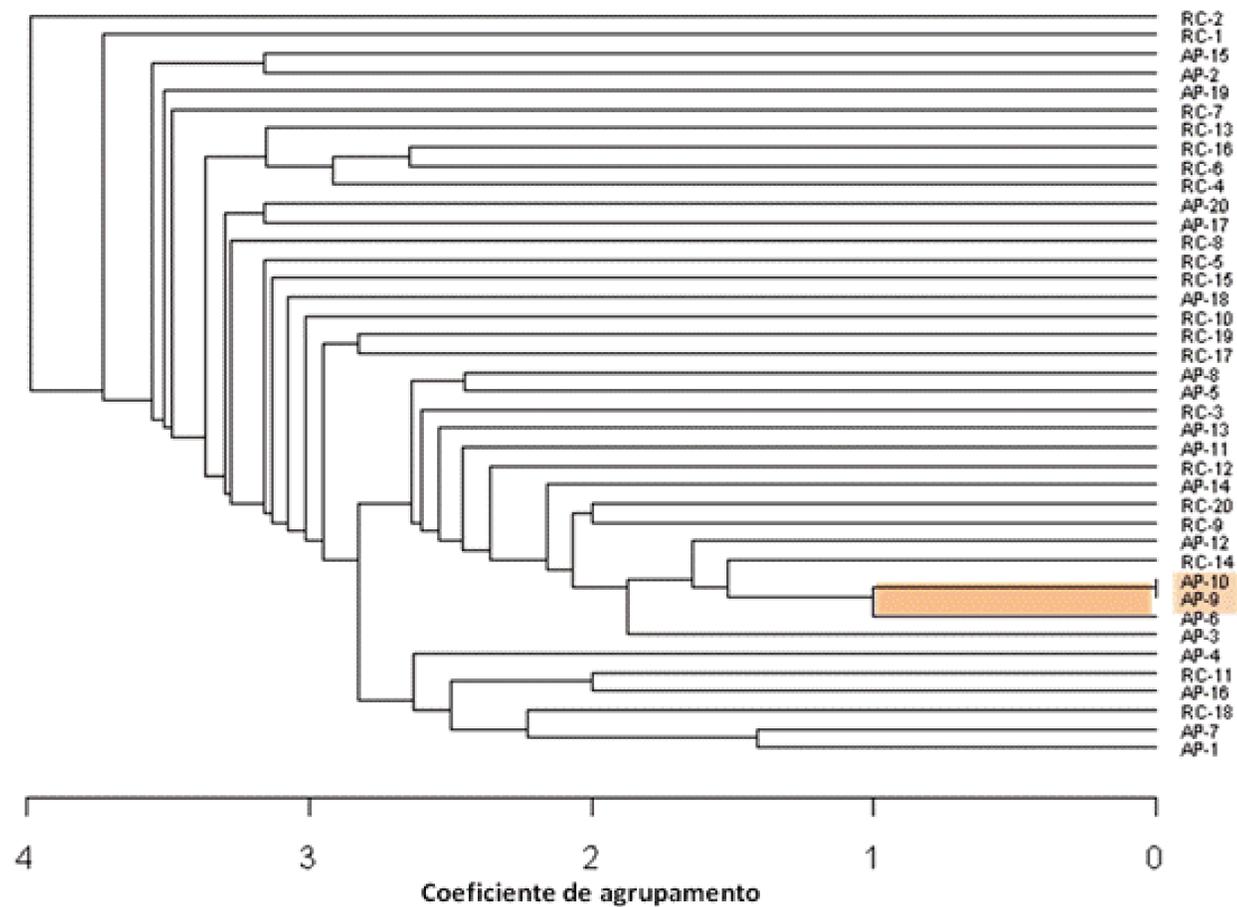


Figura 21 – Dendrograma do método de ligação completa aplicado aos dados de presença e ausência de espécies microbianas isoladas identificadas por cultura microbiana ou detectadas através dos métodos de PCR e Nested-PCR em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos. Áreas hachuradas no interior do gráfico indicam formação de grupos. Áreas hachuradas sobre os códigos das amostras demonstram alta similaridade entre as mesmas.

5.5 SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS (E-TEST)

Foram testadas as suscetibilidades antimicrobianas de 33 isolados de canais radiculares e 18 isolados de abscessos periapicais pertencentes aos grupos de *Prevotella* produtoras de pigmento negro (*P. intermedia/nigrescens*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*) e de *Prevotella* não-produtoras de pigmento negro (*P. buccae*, *P. disiens* e *P. oralis*) ou pertencentes aos gêneros *Parvimonas*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

Em 45% dos casos, observou-se a presença de ao menos uma cepa resistente a um ou mais agentes antimicrobianos testados. A **Tabela 14** apresenta as freqüências de microrganismos detectados e que apresentaram resistência aos agentes antimicrobianos, de acordo com a sua distribuição nos 20 casos clínicos estudados.

Tabela 14 – Frequência de cepas resistentes isoladas em canais radiculares e abscessos periapicais de 20 pacientes portadores de necrose pulpar e abscesso periapical agudo.

| Caso | Canal Radicular | | | Abscesso Periapical | | | Resistência |
|------|--------------------|----------------------|-------------|---------------------|----------------------|-------------|-------------|
| | Cepas ¹ | Resist. ² | Antibiótico | Cepas ¹ | Resist. ² | Antibiótico | |
| 1 | 2 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 2 | 5 | 2 | PG | 4 | 1 | EM, MZ | Sim |
| 3 | 3 | 1 | EM | 0 | 0 | - | Sim |
| 4 | 3 | 1 | AZ | 2 | 1 | EM, AZ | Sim |
| 5 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 6 | 3 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 7 | 3 | 1 | EM, AZ | 0 | 0 | - | Sim |
| 8 | 2 | 0 | - | 1 | 1 | CM | Sim |
| 9 | 1 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 10 | 3 | 1 | Todos | 0 | 0 | - | Sim |
| 11 | 1 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 12 | 0 | 0 | - | 1 | 0 | - | Não |
| 13 | 1 | 0 | - | 1 | 0 | - | Não |
| 14 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 15 | 1 | 1 | MZ | 3 | 1 | EM, MZ, AZ | Sim |
| 16 | 1 | 0 | - | 0 | 0 | - | Não |
| 17 | 1 | 0 | - | 3 | 1 | PG, EM, AZ | Sim |
| 18 | 1 | 0 | - | 2 | 0 | - | Não |
| 19 | 1 | 1 | PG, EM, MZ | 1 | 1 | PG | Sim |
| 20 | 1 | 0 | - | 1 | 0 | - | Não |
| N | 33 | 8 (24,24%) | | 18 | 6 (33,33%) | | 45% |

* (1) Cepas = número total de cepas testadas pertencentes à amostra; (2) Resist. = número de cepas resistentes a um ou mais antibióticos; PG = penicilina G; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; CM = clindamicina; EM = eritromicina; MZ = metronidazol; AZ = azitromicina.

A **Tabela 15** e a **Figura 22** demonstram o perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos dos microrganismos, independente do gênero ou do local onde foram isolados. Amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e penicilina G foram os antibióticos mais efetivos, enquanto que maiores níveis de resistência foram observados para eritromicina e azitromicina (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Tabela 15 – Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ e suscetibilidade dos microrganismos pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus* isolados de amostras de canais radiculares e abscessos periapicais (n=51).

| | CIM (µg/mL) | | Suscetibilidade | | | | | | |
|----|-------------------|-------------------|-----------------|-------|---|-------|---|-------|----|
| | | | S | | I | | R | | |
| | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | n | % | n | % | N | % | |
| PG | 0.016 | 24 | 38 | 74,51 | 7 | 13,73 | 6 | 11,76 | a |
| AC | 0.016 | 1.5 | 48 | 94,12 | 2 | 3,92 | 1 | 1,96 | a |
| XL | 0.016 | 0.5 | 48 | 94,12 | 2 | 3,92 | 1 | 1,96 | a |
| CM | 0.032 | 1 | 48 | 94,12 | 2 | 3,92 | 1 | 1,96 | ab |
| EM | 0.38 | 256 | 42 | 82,35 | - | - | 9 | 17,65 | b |
| MZ | 0.032 | 256 | 45 | 88,24 | - | - | 6 | 11,76 | ab |
| AZ | 0.125 | 4 | 42 | 82,35 | - | - | 9 | 17,65 | b |

* Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$); S = suscetível; I = intermediário; R = resistente; PG = penicilina G; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; CM = clindamicina; EM = eritromicina; MZ = metronidazol; AZ = azitromicina.

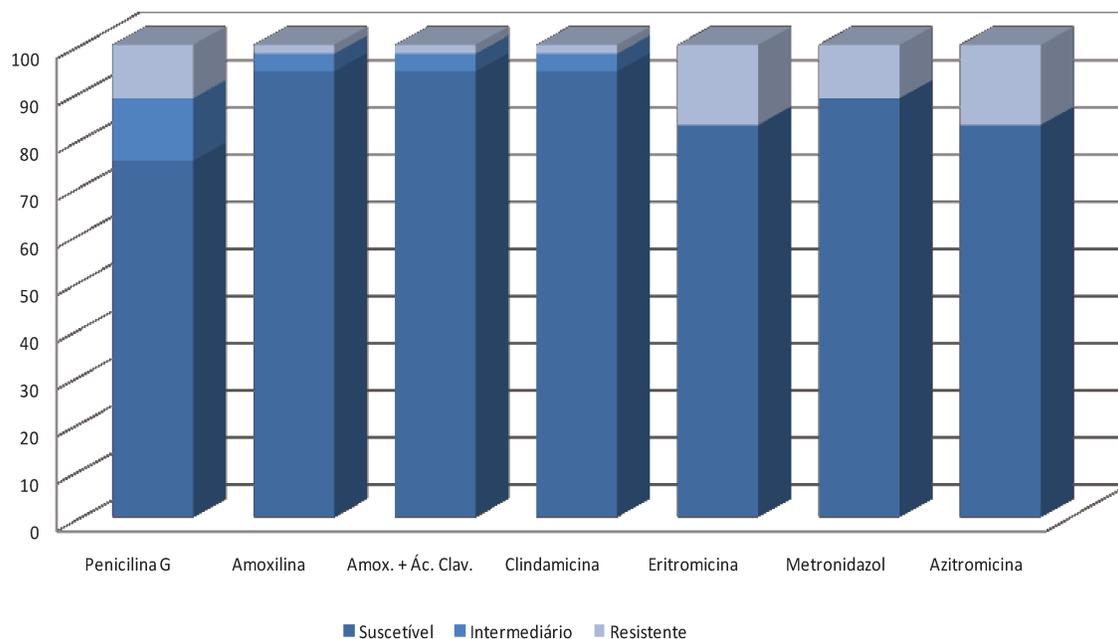


Figura 22 – Perfil dos microrganismos isolados quanto à suscetibilidade aos agentes antimicrobianos testados, em porcentagem.

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os valores de CIM para as cepas isoladas de canais radiculares ou abscessos periapicais (**Tabela 16**). As cepas isoladas dos abscessos periapicais demonstraram valores inferiores de CIM para amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, azitromicina e metronidazol quando comparadas àquelas isoladas em canais radiculares (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Tabela 16 - Comparação da suscetibilidade das cepas isoladas de canais radiculares e abscessos periapicais em amostras pareadas frente aos antibióticos testados.

| Agente Antimicrobiano | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------|-------|-------------|-------|-----------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
| | Penicilina-G | | Amoxicilina | | Amox + Ác.Clav. | | Clindamicina | | Eritromicina | | Azitromicina | | Metronidazol | |
| Local | CR | AP | CR | AP | CR | AP | CR | AP | CR | AP | CR | AP | CR | AP |
| MEDIANA | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.023 | 0.016 | 0.024 | 0.047 | 0.50 | 0.047 | 0.19 | 0.047 | 0.048 | 0.023 |
| Mínima | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 |
| 1° Quartil | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 256 | 15 | 0.023 | 0.016 | 256 | 256 | 256 | 256 |
| 3° Quartil | 0.032 | 0.079 | 0.094 | 0.77 | 0.086 | 0.039 | 0.016 | 0.016 | 1.875 | 1.825 | 0.06 | 0.016 | 0.016 | 0.016 |
| Máxima | 256 | 256 | 256 | 3 | 256 | 0.75 | 0.47 | 0.625 | 256 | 256 | 1 | 0.625 | 0.25 | 0.187 |
| Resistência | b | a | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b | a | b |
| p | 0,049 | | 0,015 | | 0,03 | | 0,043 | | 0,002 | | 0,003 | | 0,027 | |

* CR = Bactérias provenientes de canais radiculares, AP = Bactérias provenientes de abscessos periapicais; Teste de Wilcoxon para amostras pareadas; para o mesmo antibiótico, mesmas letras em linhas diferentes indicam que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); entretanto, a = grupo mais resistente, b = grupo mais suscetível.

Todas as cepas do grupo de *Prevotella* produtoras de pigmento negro isoladas em canais radiculares foram sensíveis aos agentes antimicrobianos testados. Entretanto, 33,3% das cepas isoladas de abscessos periapicais foram resistentes à penicilina G, eritromicina e metronidazol.

As cepas de *Prevotella* não-pigmentadas isoladas de canais radiculares demonstraram valores de CIM superiores frente à penicilina G quando comparadas às isoladas de abscessos periapicais (Teste de Wilcoxon, $p=0,042$).

Os antimicrobianos penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e clindamicina foram efetivos frente às cepas de *Peptostreptococcus*.

Todas as cepas do gênero *Porphyromonas* isoladas de canais radiculares e abscessos periapicais foram suscetíveis à amoxicilina, clindamicina e azitromicina.

Apenas uma cepa de *F. nucleatum* foi isolada de amostras de canais radiculares, e demonstrou ser resistente aos antibióticos testados. Entretanto, as cepas de *F. necrophorum* isoladas demonstraram ser sensíveis a todos os agentes antimicrobianos.

Os valores da CIM₅₀, CIM₉₀, valores mínimo e máximo das concentrações para cada espécie, além de sua suscetibilidade estão descritos nas **Tabelas 17 a 20**.

Tabela 17 – Valores médios de CIM₅₀ e CIM₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero *Prevotella* produtoras de pigmento negro isoladas em canais radiculares (n=4) ou abscessos periapicais (n=4) frente aos agentes antimicrobianos.

| | Amostra | CIM (µg/mL) | | | Suscetibilidade | | | | | |
|----|----------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|-----|---|---|---|-----|
| | | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Intervalo | S | | I | | R | |
| | | | | | n | % | n | % | n | % |
| PG | Canal | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.032 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.023 | - | 0.016 – 256 | 3 | 75% | - | - | 1 | 25% |
| AC | Canal | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.094 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.047 | - | 0.016 – 1.5 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| XL | Canal | 0.019 | 0.023 | 0.016 – 0.032 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.032 | - | 0.016 – 0.25 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| CM | Canal | 0.383 | 0.75 | 0.016 – 1.5 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.125 | - | 0.016 – 1.5 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| EM | Canal | 0.079 | 0.094 | 0.023 – 0.94 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.047 | - | 0.016 – 32 | 3 | 75% | - | - | 1 | 25% |
| AZ | Canal | 0.064 | 0.064 | 0.032 – 0.125 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.094 | - | 0.016 – 0.125 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| MZ | Canal | 0.142 | 0.094 | 0.023 -1.0 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.125 | - | 0.016 – 32 | 3 | 75% | - | - | 1 | 25% |

* S = suscetível; I = intermediário; R = resistente; PG = penicilina G; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; CM = clindamicina; EM = eritromicina; AZ = azitromicina; MZ = metronidazol.

Tabela 18 – Valores médios de CIM₅₀ e CIM₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero *Prevotella* não-pigmentadas, isoladas em canais radiculares (n=13) ou abscessos periapicais (n=8) frente aos agentes antimicrobianos.

| | Amostra | CIM (µg/mL) | | | Suscetibilidade | | | | | | p | |
|----|----------|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|------|---|-----|---|------|---|-------|
| | | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Intervalo | S | | I | | R | | | |
| | | | | | N | % | n | % | n | % | | |
| PG | Canal | 0.016 | 1.0 | 0.016 – 48.0 | 11 | 84,6 | 1 | 7,7 | 1 | 7,7 | A | 0,042 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.125 | 0.016 – 0.0190 | 8 | 100 | - | - | - | - | B | |
| AC | Canal | 0.032 | 0.094 | 0.016 – 6.0 | 12 | 92,3 | 1 | 7,7 | - | - | A | 0,079 |
| | Abscesso | 0.016 | 2.0 | 0.016 – 3.0 | 8 | 100 | - | - | - | - | A | |
| XL | Canal | 0.023 | 0.094 | 0.016 – 3.0 | 12 | 92,3 | 1 | 7,7 | - | - | A | 0,058 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.50 | 0.016 – 0.75 | 8 | 100 | - | - | - | - | A | |
| CM | Canal | 0.016 | 0.50 | 0.016 – 1.0 | 13 | 100 | - | - | - | - | A | 0,323 |
| | Abscesso | 0.94 | 256 | 0.016 – 256 | 5 | 62,5 | - | - | 3 | 37,5 | A | |
| EM | Canal | 0.50 | 2.0 | 0.016 – 3.0 | 13 | 100 | - | - | - | - | A | 0,318 |
| | Abscesso | 0.94 | 256 | 0.016 – 256 | 5 | 62,5 | - | - | 3 | 37,5 | A | |
| AZ | Canal | 0.75 | 1.0 | 0.016 – 2.0 | 13 | 100 | - | - | - | - | A | 0,458 |
| | Abscesso | 0.625 | 4.0 | 0.016 – 256 | 6 | 75 | - | - | 2 | 25,0 | A | |
| MZ | Canal | 0.032 | 0.19 | 0.016 – 0.25 | 13 | 100 | - | - | - | - | A | 0,147 |
| | Abscesso | 0.137 | 256 | 0.016 – 256 | 6 | 75 | - | - | 2 | 25,0 | A | |

* S = suscetível; I = intermediário; R = resistente; PG = penicilina G; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; CM = clindamicina; EM = eritromicina; AZ = azitromicina; MZ = metronidazol; Teste de Wilcoxon para amostras pareadas; para o mesmo antibiótico, mesmas letras em linhas diferentes indicam que não há diferença estatisticamente significativa (p<0,05); entretanto, a = grupo mais resistente, b = grupo mais suscetível.

Tabela 19 – Valores médios de CIM₅₀ e CIM₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero *Parvimonas*, isoladas em canais radiculares (n=9) ou abscessos periapicais (n=4) frente aos agentes antimicrobianos.

| | Amostra | CIM (µg/mL) | | | Suscetibilidade | | | | | | p | |
|----|----------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|------|---|---|---|------|---|-------|
| | | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Intervalo | S | | I | | R | | | |
| | | | | | N | % | n | % | n | % | | |
| PG | Canal | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.032 | 9 | 100 | - | - | - | - | A | 0,172 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.064 | 4 | 100 | - | - | - | - | A | |
| AC | Canal | 0.016 | 0.064 | 0.016 – 0.064 | 9 | 100 | - | - | - | - | A | 0,009 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.023 | 4 | 100 | - | - | - | - | B | |
| XL | Canal | 0.032 | 0.094 | 0.016 – 0.094 | 9 | 100 | - | - | - | - | A | 0,004 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.023 | 4 | 100 | - | - | - | - | B | |
| CM | Canal | 0.047 | 0.50 | 0.016 – 0.75 | 9 | 100 | - | - | - | - | A | 0,046 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 0.50 | 4 | 100 | - | - | - | - | B | |
| EM | Canal | 0.50 | 256 | 0.016 – 256 | 7 | 77,2 | - | - | 2 | 22,8 | A | 0,003 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 1.0 | 4 | 100 | - | - | - | - | B | |
| AZ | Canal | 0.25 | 2.0 | 0.016 – 256 | 8 | 88,9 | - | - | 1 | 11,1 | A | 0,006 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.023 | 0.016 – 0.064 | 4 | 100 | - | - | - | - | B | |
| MZ | Canal | 0.38 | 16 | 0.016 – 16 | 6 | 66,6 | - | - | 3 | 33,3 | A | 0,003 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.047 | 0.016 – 0.50 | 4 | 100 | - | - | - | - | B | |

* S = suscetível; I = intermediário; R = resistente; PG = penicilina G; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; CM = clindamicina; EM = eritromicina; AZ = azitromicina; MZ = metronidazol; Teste de Wilcoxon para amostras pareadas; para o mesmo antibiótico, mesmas letras em linhas diferentes indicam que não há diferença estatisticamente significativa (p<0,05); entretanto, a = grupo mais resistente, b = grupo mais suscetível.

Tabela 20 – Valores médios de CIM₅₀ e CIM₉₀ e da suscetibilidade das cepas do gênero *Porphyromonas*, isoladas em canais radiculares (n=4) ou abscessos periapicais (n=2) frente aos agentes antimicrobianos.

| | Amostra | CIM (µg/mL) | | | Suscetibilidade | | | | | |
|----|----------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|-----|---|----|---|----|
| | | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Intervalo | S | | I | | R | |
| | | | | | n | % | n | % | n | % |
| PG | Canal | 0.016 | 24 | 0.016 – 256 | 2 | 50 | - | - | 2 | 50 |
| | Abscesso | 0.016 | 256 | 0.016 – 256 | 1 | 50 | - | - | 1 | 50 |
| AC | Canal | 0.016 | 0.094 | 0.016 – 6 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.016 | 1.5 | 0.016 – 1.5 | 2 | 100 | - | - | - | - |
| XL | Canal | 0.016 | 0.064 | 0.016 – 4 | 3 | 75 | 1 | 25 | - | - |
| | Abscesso | 0.016 | 0.047 | 0.016 – 0.047 | 2 | 100 | - | - | - | - |
| CM | Canal | 0.016 | 0.125 | 0.016 – 0.38 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.016 | 0.094 | 0.016 – 0.094 | 2 | 100 | - | - | - | - |
| EM | Canal | 0.50 | 0.75 | 0.016 – 256 | 3 | 75 | - | - | 1 | 25 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.046 | 0.016 – 0.046 | 2 | 100 | - | - | - | - |
| AZ | Canal | 0.016 | 0.125 | 0.016 – 0.25 | 4 | 100 | - | - | - | - |
| | Abscesso | 0.016 | 0.075 | 0.016 – 0.075 | 2 | 100 | - | - | - | - |
| MZ | Canal | 0.016 | 0.016 | 0.016 – 256 | 3 | 75 | - | - | 1 | 25 |
| | Abscesso | 0.016 | 0.016 | - | 2 | 100 | - | - | - | - |

* S = suscetível; I = intermediário; R = resistente; PG = penicilina G; AC = amoxicilina; XL = amoxicilina + ácido clavulânico; CM = clindamicina; EM = eritromicina; AZ = azitromicina; MZ = metronidazol; Teste de Wilcoxon para amostras pareadas; para o mesmo antibiótico, mesmas letras em linhas diferentes indicam que não há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); entretanto, a = grupo mais resistente, b = grupo mais suscetível.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS DAS COMUNIDADES MICROBIANAS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS DE CANAIS RADICULARES E ABSCESSOS PERIAPICAIS AGUDOS

A infecção presente no interior do canal radicular é a fonte inicial de microrganismos que atingem os tecidos periapicais, formando o abscesso periapical agudo (Torabinejad, 1994). Torna-se necessária a descrição da diversidade microbiana e da similaridade dos perfis de amostras pertencentes às estas infecções endodônticas relacionadas. O emprego de métodos de ampla detecção, tais como a análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição e a cultura microbiana, é adequado para a caracterização abrangente de amostras provenientes de microbiomas que apresentam uma grande diversidade populacional.

6.1.1 Técnica do Polimorfismo do Fragmento Terminal de Restrição

A técnica da Análise do Polimorfismo do Comprimento no Fragmento Terminal de Restrição é uma técnica molecular de ampla detecção, não-seletiva que enumera taxas microbianas cultiváveis, de difícil cultivo e ainda não-cultiváveis, permitindo a comparação dos perfis de comunidades polimicrobianas complexas, tais como as encontradas em infecções endodônticas primárias (Sakamoto *et al.*, 2006; Hommez *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2009). Esta técnica é baseada no comprimento e na fluorescência de fragmentos de restrição gerados após a digestão com enzimas de restrição (Marsh, 1999).

No presente estudo, foram empregados os fluoróforos HEX e FAM ligados aos primers *forward* e *reverse*, respectivamente, durante a reação de amplificação, previamente à digestão com a enzima *MspI*. Schütte *et al.* (2008) relataram que diferentes espécies podem apresentar comprimentos de fragmento similares, o que poderia produzir a não-diferenciação de espécies que apresentam similaridade na estrutura do gene 16S rRNA. Avaniss-Aghajani *et al.* (1996) relatam que o uso de mais de uma enzima de restrição e de mais de um corante fluorescente pode reduzir esse evento. Dessa forma, o número de fragmentos/espécies para cada amostra de canal radicular ou abscesso periapical correspondeu à média aritmética obtida entre a soma do número de fragmentos gerados para cada um dos fluoróforos, minimizando a possibilidade de falsas identificações ou mesmo não-detecção de espécies.

Amostras de canais radiculares apresentaram 103 espécies microbianas diferentes, concordando com os relatos prévios de Sakamoto *et al.* (2006) e Saito *et al.* (2009). Entretanto, o número de espécies detectadas foi maior que aqueles obtidos através da técnica de clonagem microbiana, que também permite a avaliação não-específica de comunidades microbianas (Dymock *et al.*, 1996; Jacinto *et al.*, 2007; Riggio *et al.*, 2007). Este fato justifica-se, pois diversas espécies podem estar presentes em quantidade inferior ao nível de detecção do método de clonagem e sequenciamento.

A distribuição das espécies parece ser única em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais em cada indivíduo, uma vez que nenhum fragmento de restrição foi detectado em todas as amostras, mas a maioria foi observada em uma única amostra. Este resultado é concordante com estudos prévios em infecções endodônticas agudas que também demonstraram diferentes perfis microbianos entre amostras (Munson *et al.*, 2002; Machado de Oliveira *et al.*, 2007; Jacinto *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2009), com a grande maioria das espécies detectada em apenas uma amostra. Estes dados sugerem que diferentes comunidades microbianas podem constituir a base etiológica da mesma doença (Siqueira *et al.*, 2008b; Saito *et al.*, 2009). Estudos adicionais devem ser

conduzidos para determinar os níveis individuais das espécies em infecções de canais radiculares e periapicais, e a sua relativa importância no balanço de cada comunidade.

O número médio de espécies e o índice de diversidade de Shannon-Wiener para as amostras de canais radiculares e de abscessos periapicais não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Entretanto, poucas espécies foram detectadas simultaneamente em amostras pareadas, sugerindo que as comunidades apresentam composição diferenciada. Enquanto que as bactérias que colonizam o canal radicular estão protegidas, as bactérias que invadem os tecidos periapicais estão sob influência constante dos mecanismos de defesa do organismo (Sakamoto *et al.*, 2006; Siqueira & Rôças, 2009a; Siqueira & Rôças, 2009b). Pressões seletivas relacionadas a fatores nutricionais podem influenciar a composição da microbiota presente nos dois ecossistemas (Grenier & Mayrand, 1986). Os resultados sugerem a presença de comunidades microbianas diferentes em infecções relacionadas e que participam de uma mesma doença.

As infecções endodônticas são causadas por agentes microbianos endógenos, e diferenças estruturais na microbiota oral podem influenciar a sua composição. Estudos de Ide *et al.* (2000) e Haffajee *et al.* (2004) demonstram que a microbiota oral de pacientes saudáveis e de lesões periodontais subgingivais diferem significativamente de acordo com a localização geográfica. Achados similares foram relatados por Rôças *et al.* (2006a) ao compararem a microbiota de amostras de abscessos periapicais agudos obtidas em Portland (Oregon, EUA) e no Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). No presente estudo, a análise dos dados permitiu estabelecer correlações entre a composição da microbiota das amostras de canais radiculares e exsudatos de abscessos periapicais agudos ao hábito de fumar e à presença de episódios de dor prévia.

O fumo é considerado um importante fator de risco para a presença de tratamentos endodônticos na cavidade oral de pacientes. Krall *et al.* (2006) demonstraram em uma análise longitudinal que fumantes apresentavam 1,7 vezes

mais chances de terem realizado tratamento endodôntico que não-fumantes. Os resultados do presente estudo demonstraram uma menor diversidade de espécies em canais radiculares de pacientes fumantes. Zambon *et al.* (1996) e Van Winkelhoff *et al.* (2001) relataram que a composição da microbiota da placa subgengival de pacientes fumantes é diferente daquela dos não-fumantes, apresentando níveis superiores de *P. micra*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and "*B. forsythus*". É possível que o fumo exerça um efeito seletivo similar na composição da microbiota dos canais radiculares em pacientes fumantes, uma vez que a cavidade oral e a placa bacteriana são as principais fontes dos microrganismos que estão presentes nas infecções endodônticas (Okayama *et al.*, 2005). O fumo pode ainda suprimir funções leucocitárias como quimiotaxia e fagocitose (Sasagawa *et al.*, 1985) que poderiam favorecer a invasão e colonização dos tecidos pulpar em degeneração e os tecidos periapicais.

Pacientes que relataram história de dor prévia demonstraram um menor número de espécies e uma maior diversidade de espécies que compunham as comunidades microbianas. Como o índice de diversidade de Shannon-Wiener é uma medida que considera o número de espécies e a abundância de cada espécie, os dados sugerem que pacientes que relataram dor prévia apresentam um número maior de microrganismos que podem participar da infecção endodôntica. Este resultado concorda com Gomes *et al.* (1996), que demonstraram que infecções endodônticas primárias sem sintomatologia dolorosa espontânea apresentam uma microbiota mais complexa, composta por bactérias anaeróbias estritas e facultativas, sugerindo que o fator tempo pode influenciar na composição da microbiota desses ecossistemas.

6.1.2 Técnica de Cultura Microbiana e Identificação Bioquímica

O método de cultura microbiana é inespecífico e possibilita a identificação de uma grande variedade de espécies, a determinação da suscetibilidade aos antibióticos e o estudo da fisiologia celular microbiana (Siqueira & Rôças, 2005a). Entretanto, uma de suas maiores contribuições é a determinação da presença de microrganismos viáveis nas amostras, o que não é facilmente realizado através do emprego isolado de métodos moleculares de diagnóstico, que estudam o gene 16S rRNA.

As infecções endodônticas primárias são constituídas por interações entre espécies de microrganismos. Estudos sugerem que a presença ou ausência de sintomatologia está associada às características específicas da composição microbiana, tanto qualitativa quanto quantitativamente (Sundqvist, 1976; Yoshida *et al.*, 1987; Hashioka *et al.*, 1992).

No presente estudo, todas as amostras de canais radiculares apresentaram crescimento microbiano, concordando com os achados de Jacinto *et al.* (2003). Trabalhos anteriores de Keudell *et al.* (1976) demonstraram crescimento bacteriano em apenas 64% dos casos, entretanto em 2003, Sousa *et al.* relataram que em apenas um caso de infecções primárias sintomáticas não se observou crescimento microbiano. O emprego de meios de transporte pré-reduzidos e de meios de cultura enriquecidos favoreceu a recuperação dos microrganismos após a coleta clínica. A observância destes fatores foi destacada inicialmente por Morse (1981) e são determinantes para que o método de cultura microbiana seja efetivo.

O crescimento microbiano foi observado em apenas 70% das amostras de abscessos periapicais. Agentes antimicrobianos foram administrados via oral para os 6 pacientes que apresentavam abscesso periapical difuso, 30 minutos antes da realização do procedimento de drenagem cirúrgica da coleção purulenta

(Souza Filho *et al.*, 2002). Destes, apenas 2 amostras não apresentaram microrganismos passíveis de cultivo. Ao estudarem abscessos periapicais em pacientes que tinham utilizado ampicilina por 7 dias antes do procedimento, Sklavounos *et al.* (1986) observaram que não houve alteração na composição microbiana das amostras quando comparados aos casos onde não haviam sido prescritos agentes antimicrobianos. Os autores sugerem que os agentes antimicrobianos não parecem ser efetivos nos tecidos alterados pela infecção aguda e não atingem concentração inibitória mínima para as cepas presentes no exsudato purulento/sanguinolento. Características de biodisponibilidade, biodistribuição e biotransformação também podem afetar as concentrações do fármaco no sítio de ação desejado. O tempo necessário para que a dose de 500 mg de amoxicilina atinja concentrações séricas máximas de 6 a 8 µg/mL é de 2 horas após sua administração oral (Silva, 2002), tornando restrita a sua ação no interior da coleção purulenta.

Foram isolados em canais radiculares 96 microrganismos, distribuídos em 24 gêneros e pertencentes a 36 espécies, com uma média de 4 a 6 espécies por canal radicular. As amostras de exsudatos de abscesso periapicais agudos abrigavam uma média de 2 a 5 microrganismos, pertencentes a 25 espécies e distribuídos em 18 gêneros. Os resultados são concordantes com a literatura ao indicar que a infecção endodôntica primária associada à sintomatologia dolorosa é polimicrobiana, tanto em canais radiculares (Gomes *et al.*, 1994a; Gomes *et al.*, 1994b; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003) quanto em abscessos periapicais agudos (Brook *et al.*, 1981; Khemaleelakul *et al.*, 2002; Riggio *et al.*, 2007), e constituída por um número limitado de espécies.

A população microbiana dos canais radiculares estudados abrigava 82,5% de cepas anaeróbias estritas e 17,5% de anaeróbios facultativos. Em 95% dos casos avaliados, estava presente ao menos uma espécie fastidiosa. Jacinto *et al.* (2003) relataram que 72% das cepas em casos de infecções endodônticas primárias sintomáticas eram anaeróbios estritos, e que estes estavam em maior número quando comparados às infecções assintomáticas. Os microrganismos

anaeróbios estritos que colonizam o canal radicular infectado são residentes no próprio hospedeiro (Finegold, 1993). As diversas relações ecológicas que se estabelecem no interior dos canais radiculares ocasionam uma diminuição da tensão de oxigênio e do potencial de óxido-redução, favorecendo a infecção por microrganismos anaeróbios estritos (Gharbia & Shah, 1993). A presença concomitante de microrganismos facultativos e anaeróbios estritos foi observada em 40% casos, uma vez que nos demais casos apenas anaeróbios estritos foram encontrados. Yoshida *et al.* (1987) e Martinho (2007) sugerem que espécies facultativas estão associadas a ausência de sintomatologia dolorosa espontânea.

A microbiota dos exsudatos coletados a partir de abscessos periapicais agudos constituía-se de 91,1% de espécies anaeróbias estritas e 8,9% de facultativos. Os cuidados de assepsia durante a coleta e a evolução das técnicas transporte e cultivo microbiano permitiram o isolamento de altas taxas de microrganismos anaeróbios estritos em amostras de abscessos periapicais agudos (Aderhold *et al.*, 1981; Von Konow *et al.*, 1981). A introdução destes procedimentos reduziu o número de casos sem crescimento microbiano em ambiente laboratorial e também a identificação predominante de microrganismos comensais da pele pertencentes aos gêneros *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp (Aderhold *et al.*, 1981). A presença concomitante de microrganismos anaeróbios estritos e facultativos foi observada em 40% das amostras e parece ser importante para a instalação de infecções nos tecidos periapicais. Sklavounos *et al.* (1986) sugerem que os microrganismos anaeróbios facultativos preparam o ecossistema e favorecem a instalação dos anaeróbios estritos, pois reduzem a concentração do oxigênio tecidual.

Em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, houve predomínio de cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, concordando com os resultados de Sousa *et al.* (2003), Von Konow *et al.* (1981) e Riggio *et al.* (2007). As endotoxinas, presentes em bactérias Gram-negativas, consistem primariamente de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa dessas bactérias (Koneman *et al.*, 2002). Jacinto *et al.* (2005) demonstraram uma

correlação positiva entre a presença de endotoxinas bacterianas e o desenvolvimento de sintomatologia dolorosa.

Parvimonas micra foi uma das espécies mais freqüentemente isoladas nos canais radiculares e em abscessos periapicais, através do método de cultura microbiana. *P. micra* é um coco Gram-positivo anaeróbio estrito, comumente encontrado nas mucosas da cavidade oral, intestinos e vagina. Rams *et al.* (1992) relataram a sua participação no desenvolvimento de periodontites, sendo dificilmente isolado em placa bacteriana de indivíduos saudáveis. Tanabe *et al.* (2007) demonstraram, *in vitro*, a capacidade de componentes da parede celular de *P. micra* em induzir vias de sinalização intracelular em macrófagos, aumentando a produção de citocinas, quimiocinas e MMP-9. Gomes *et al.* (2004) isolaram este microrganismo em 35% dos casos de infecções primárias, e sua presença esteve associada à dor. Van Dalen *et al.* (1998) demonstraram *in vitro* que a associação entre *P. micra* e diferentes cepas do bacilo Gram-negativo *Prevotella intermedia* favoreceu o desenvolvimento de abscessos, tornando-os mais agressivos.

As bactérias produtoras de pigmento negro (BPPN) são bacilos anaeróbios Gram-negativos que colonizam as mucosas, sendo indígenas da cavidade oral. Quando cultivados em ágar, apresentam a capacidade de produzir pigmento negro, caracterizado quimicamente como protohemina e protoporfirina (Shah & Gharbia, 1993). Algumas espécies pertencentes ao gênero *Prevotella* não são pigmentadas, tais como *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Prevotella buccae*, *Prevotella bucalis*, *Prevotella oralis* e *Prevotella oris*. Inicialmente, todas as espécies de BPPN estavam agrupadas em um único gênero, *Bacteroides*. Shah & Collins (1988) e Shah & Collins (1990) propuseram sua divisão, baseando-se em características nutricionais, análises químicas e bioquímicas. As espécies sacarolíticas foram agrupadas no gênero *Prevotella*, enquanto que espécies assacarolíticas pertencem ao gênero *Porphyromonas*. Ao avaliarem a presença de BPPN em infecções endodônticas primárias e secundárias, Gomes *et al.* (2005) isolaram essas espécies em 22% e 4% dos casos, respectivamente. Haapasalo *et al.* (1986) relataram a presença freqüente de *P. endodontalis* e *P. gingivalis*

apenas em casos sintomáticos, enquanto que *P. intermedia/nigrescens* foi o BPPN que predominou em casos assintomáticos.

As espécies *P. intermedia/nigrescens* estiveram presentes em 20% das amostras de canais radiculares (4/20), concordando com Sousa (2003) e Jacinto (2007), que isolaram esses microrganismos em 26,7% e 23%, respectivamente, de casos que apresentavam sintomatologia dolorosa. As taxas de identificação de *P. intermedia/nigrescens* reportadas na literatura em infecções endodônticas primárias são variáveis e esse fato pode estar relacionado às características específicas de cada tipo de infecção (Gomes *et al.*, 2005). No presente estudo, *P. endodontalis* foi isolada em baixa frequência, mesmo empregando-se métodos adequados de coleta e processamento das amostras, concordando com o trabalho de van Winkelhoff *et al.* (1986). Estes autores associaram as baixas taxas de isolamento de *P. endodontalis* a sua extrema sensibilidade à presença de oxigênio, mesmo empregando-se técnicas de coleta e cultivo criteriosas.

Prevotella intermedia/nigrescens, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* foram isoladas em poucos casos de abscessos periapicais agudos no presente estudo, concordando com resultados de Sabiston *et al.* (1976), Lewis *et al.* (1986) e Riggio *et al.* (2007).

As espécies não-pigmentadas *Prevotella buccae*, *Prevotella oralis* e *Prevotella disiens* foram isoladas com grande frequência dos canais radiculares estudados. Jacinto *et al.* (2003) isolaram um maior número de cepas de *Prevotella* em casos sintomáticos que assintomáticos. Para Gomes *et al.* (2004), isolaram com menor frequência *Prevotella oralis* e *Prevotella buccae* dos canais radiculares com infecção primária e dos canais com insucesso do tratamento endodôntico. No presente estudo, cepas pertencentes ao gênero *Prevotella* foram identificadas em baixa frequência nas amostras de abscessos periapicais agudos. Entretanto, Khemaleelakul *et al.* (2002) constataram que cepas do gênero *Prevotella* constituíam cerca de 83% das unidades formadoras de colônia em coleções

purulentas de abscessos periapicais, com alta incidência de *Prevotella oralis* e *Prevotella buccae*.

Gemella morbillorum foi um dos microrganismos mais freqüentemente isolados, estando presente em 40% dos canais radiculares. Gomes *et al.* (2008) observaram freqüência similar de detecção nas amostras de infecções primárias, sendo isolada em 36% das amostras de canais radiculares. La Scolla & Raout (1998) relataram que esta espécie apresenta comportamento variável frente ao oxigênio, podendo ser anaeróbio estrito ou facultativo. Em nosso estudo, todas as cepas eram Gram-positivas e anaeróbias estritas.

No presente estudo, *Gemella morbillorum* foi identificada em 20% das amostras de abscessos periapicais agudos. Brouqui & Raoult (2001) salientaram que espécies do gênero *Gemella* são freqüentemente relacionadas a patologias sistêmicas e, devido à difícil caracterização fenotípica e bioquímica, sua incidência pode ter sido subestimada. Grande parte dos estudos que descreveram a microbiota de abscessos periapicais agudos data das décadas de 80 e 90 (Sabiston *et al.*, 1976; Aderholt *et al.*, 1981; Brook *et al.*, 1981; Von Konow *et al.*, 1981; Oguntebi *et al.*, 1982; Sklavounos *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 1986; Brook *et al.*, 1991; Brook *et al.*, 1996). Devido a sua instabilidade frente à coloração de Gram, as cepas pertencentes ao gênero *Gemella* spp. foram previamente caracterizadas como *Neisseria* spp. (La Scolla & Raoult, 1998; Akyiama *et al.*, 2001) ou mesmo estreptococos do grupo viridans. Estes são estreptococos α -hemolíticos, formando hemólise incompleta no meio de cultura. Pertencem ao grupo *Streptococcus sanguis*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. salivarius* e *S. vestibularis*. Estudos recente de Khemaleelakul *et al.* (2002), empregando cultura microbiana, determinaram uma alta incidência de *G. morbillorum* em abscessos periapicais agudos.

A espécie *Propionibacterium acnes* foi isolada em 4/20 amostras de abscessos periapicais agudos e parece ser um importante patógeno no desenvolvimento de infecções extrarradiculares. Embora os fatores associados a

sua patogenicidade não estejam totalmente esclarecidos, os microrganismos do gênero *Propionibacterium* spp. compartilham características de invasibilidade tecidual similar à dos *Actinomyces* spp. (Siqueira & Rôças, 2003h). Sunde *et al.* (2002) identificaram esta espécie em grânulos sulfurosos coletados de lesões periapicais crônicas, associadas aos microrganismos *Actinomyces israelii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, e *A. meyeri*, em casos de insucesso do tratamento endodôntico.

Os resultados fornecidos pelos métodos de análise do comprimento do fragmento terminal de restrição e de cultura microbiana com identificação bioquímica permitiram estabelecer que a estrutura das comunidades microbianas associadas em infecções primárias sintomáticas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos é complexa e heterogênea. Embora algumas espécies sejam freqüentemente identificadas, as infecções em ambos ecossistemas apresentam-se como um grupo de microrganismos distribuídos de forma aleatória, não constituindo núcleo único de espécies. Dessa forma, mais de uma comunidade microbiana pode estar associada ao estabelecimento de uma patologia com sinais e sintomas clínicos similares, caracterizada pela presença de necrose pulpar, dor espontânea, dor à percussão e edema.

6.2. DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS ATRAVÉS DE PCR E NESTED-PCR

A infecção endodôntica primária em casos em que a sintomatologia dolorosa espontânea está presente é constituída principalmente por microrganismos anaeróbios estritos, de difícil cultivo, ainda não cultivados ou desconhecidos (Rôças *et al.*, 2005a; Sakamoto *et al.*, 2006). A recuperação de microrganismos fastidiosos é limitada quando os métodos de cultura microbiana são empregados, devido às limitações de técnica ou mesmo devido às características celulares, como a pequena quantidade de células ou viabilidade

dos mesmos (Siqueira & Rôças, 2005a), sendo necessária a associação de métodos moleculares de diagnóstico, por exemplo, PCR e Nested-PCR. Os bacilos anaeróbios produtores de pigmento negro (*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tannerae*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*), os fastidiosos *Tannerella forsythia* e *Filifactor alocis*, o Gram-positivo *Parvimonas micra* e as espiroquetas do gênero *Treponemas* spp. são importantes patógenos humanos e já foram relacionados aos sinais e sintomas de origem endodôntica (Siqueira *et al.*, 2001a; Rôças *et al.*, 2002a; Rôças *et al.*, 2003a; Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006a; Gomes *et al.*, 2007). Entretanto, a sua detecção em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais ainda não foi reportada na literatura.

Dentre os microrganismos anaeróbios estritos selecionados para o estudo através do método de PCR, a espécie *Porphyromonas endodontalis* foi a mais freqüentemente detectada em amostras de canais radiculares (55% dos casos) e abscessos periapicais agudos (45% dos casos). As taxas de detecção desta espécie são variáveis. Siqueira *et al.* (2001b) relataram a presença de *P. endodontalis* em 70% dos casos de abscessos periapicais agudos, enquanto que Gomes *et al.* (2005) relataram a sua ocorrência em 25% das amostras de canais radiculares com necrose pulpar. Rôças *et al.* (2002a) observaram uma maior incidência de *P. endodontalis* em canais radiculares com infecções primárias assintomáticas (57%) que naqueles com infecções sintomáticas (31%).

P. gingivalis foi detectada em 15% das amostras de canais radiculares e em 15% das amostras de abscessos periapicais, entretanto detecção simultânea ocorreu em apenas 5%. Gomes *et al.* (2005) relatam que *P. gingivalis* foi detectada em 38% dos canais radiculares com necrose pulpar, enquanto que Siqueira *et al.* (2001b) observaram esta espécie em 40% das amostras de abscessos periapicais agudos. Taxas similares de detecção foram reportadas por Rôças *et al.* (2002a) quando estas espécies foram estudadas em amostras de infecções endodônticas primárias sintomáticas e assintomáticas. Os resultados de Gomes *et al.* (2007) indicam a relação de *P. gingivalis* com infecções sintomáticas,

pois a presença deste microrganismo em canais radiculares esteve associado à edema, mobilidade e presença de abscesso periapical agudo.

Van Winkelhoff *et al.* (1986) relataram que as espécies do gênero *Porphyromonas* spp. têm a habilidade de inibir a presença de outros bacilos produtores de pigmento negro anaeróbios, tais como *Prevotella* spp. Entretanto, em nosso estudo este fato não foi confirmado, pois a presença concomitante de *P. endodontalis/P. gingivalis* e *P. intermedia/nigrescens* ocorreu em 4 amostras de canais radiculares e em 8 amostras de abscessos periapicais, conforme resultados apresentados no **ANEXO XIII**.

As espécies *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella tanneriae* não são diferenciadas através dos métodos de identificação bioquímica (Xia *et al.*, 2000). Em amostras de canais radiculares, apenas a espécie *P. nigrescens* foi detectada em 40% dos casos. Entretanto, em amostras de abscessos periapicais, observou-se taxas de detecção de 45% para *P. nigrescens*, 30% para *P. tanneriae* e 20% para *P. intermedia*. O predomínio de *P. nigrescens* em amostras de canais radiculares com necrose pulpar foi observado também por Bae *et al.* (1997) e Baumgartner *et al.* (1999) Entretanto, em abscessos periapicais agudos, Siqueira *et al.* (2001b) relataram que *P. intermedia* foi encontrada em 59% dos casos e *P. nigrescens* esteve ausente nas amostras. Gomes *et al.* (2005) detectaram *P. intermedia* mais freqüentemente que *P. nigrescens* em amostras de canais radiculares com necrose pulpar. Os autores também reportam que em algumas amostras, *P. intermedia/nigrescens* foi identificada através dos métodos bioquímicos, mas não foram detectadas através do Nested-PCR empregando-se primers específicos. Uma das possíveis explicações seria a menor precisão de resultados fornecidos pela identificação bioquímica, pois espécies como *P. tanneriae*, que não foram incluídas no estudo, poderiam apresentar perfis similares à *P. intermedia/nigrescens*.

O microrganismo *Filifactor alocis* apresenta crescimento lento em seu isolamento primário e demonstra ser inerte frente à reação com substratos durante

os testes bioquímicos, tornando sua identificação dificultada. No presente estudo, *F. alocis* foi detectado em 35% das amostras de canais radiculares e 35% das amostras de abscessos periapicais, sendo que em apenas 10% dos casos ocorreu em ambas infecções, de um mesmo paciente. Resultados similares foram reportados por Siqueira *et al.* (2003g), que observaram a presença de *F. alocis* em 30% das amostras de canais radiculares com necrose pulpar associados à periodontite apical aguda e em 42,2% de exsudatos de abscessos periapicais. Altas taxas de detecção foram relatadas por Gomes *et al.* (2006a), principalmente em infecções primárias, estando associado à presença de dor espontânea, edema, exsudato purulento em canais radiculares e à presença de abscessos periapicais.

Tannerella forsythia é um bacilo Gram-negativo anaeróbio freqüentemente detectado em amostras de placa bacteriana obtida em bolsas periodontais profundas (Rudney *et al.*, 2003). No presente estudo, *T. forsythia* foi detectada em canais radiculares (35%) e em abscessos periapicais agudos (30%). A detecção simultânea nos dois ecossistemas ocorreu em apenas 10% dos casos. Embora detectadas em apenas 4% das amostras, Siqueira *et al.* (2004e) sugerem a sua associação ao desenvolvimento de lesões periapicais crônicas. Gomes *et al.* (2006a) relatam que *T. forsythia* foi isolada em maior freqüência em amostras de infecções endodônticas primárias do que em secundárias. Gomes *et al.* (2007) demonstraram associação positiva para a detecção simultânea de *T. forsythia* e *T. denticola* e desenvolvimento de dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação e edema.

A alta incidência dos microrganismos *F. alocis* e *T. forsythia* e a sua associação com sinais e sintomas de origem endodôntica reportada em estudos na literatura (Siqueira *et al.*, 2003g; Gomes *et al.*, 2006a; Gomes *et al.*, 2007), demonstra a sua importância como patógenos no desenvolvimento da infecção primária associada à sintomatologia dolorosa.

P. micra é um microrganismo anaeróbio estrito freqüentemente isolado em amostras de infecções endodônticas através do método de cultura microbiana (Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004). Os resultados do presente estudo não demonstram freqüências diferenciadas para a presença de *P. micra* em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais avaliadas através de cultura microbiana ou métodos moleculares. Tally *et al.* (1975) observaram que, mesmo após 8-9 horas de exposição ao oxigênio atmosférico, todas as cepas de *P. micra* encontravam-se viáveis, enquanto que após 72 horas, 63% delas sobreviveram. Assim, embora sendo anaeróbios estritos, estas cepas não apresentam sensibilidade exacerbada à presença do oxigênio. *P. micra* foi detectado em 25% dos canais radiculares e 35% dos exsudatos de abscessos periapicais, e em apenas 10% de ambas as amostras pareadas. Resultados similares foram relatados por Siqueira *et al.* (2003d), onde 25% das amostras de canais radiculares associados à periodontites apicais agudas e 30% das amostras de abscessos periapicais apresentavam o microrganismo. A presença de *P. micra* em infecções endodônticas sintomáticas pode estar relacionada ao fato de que esta espécie favorece a patogenicidade de outros anaeróbios estritos freqüentemente isolados (Sundqvist *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1994a; Gomes *et al.*, 1994b).

A detecção de treponemas em infecções endodônticas tem sido realizada através de diferentes métodos, tais como PCR (Rôças *et al.*, 2003a; Siqueira & Rôças, 2003e; Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2007), hibridização DNA-DNA (Rôças & Siqueira, 2008; Sassone *et al.*, 2008), “checkerboard” de captura reversa (Siqueira & Rôças, 2009c), PCR em tempo real (Ozbek *et al.*, 2009) e análise de clones e seqüenciamento gênico (Jacinto *et al.*, 2007). Jacinto *et al.* (2007) não detectaram a presença de espécies de treponemas em amostras de canais radiculares de dentes que apresentavam abscesso periapical quando o gene 16S rRNA foi amplificado e clonado. Kumar *et al.* (2005) relatam que devido aos baixos níveis de concentração de DNA, resultante do pequeno número de células microbianas da espécie presentes na amostra, a presença de algumas espécies pode ser subestimada pelos métodos de análise de clones. O método do

Nested-PCR foi empregado porque apresenta alta sensibilidade e especificidade para a detecção de espécies microbianas, pois envolve a dupla amplificação do DNA bacteriano, através de reações consecutivas, uma inespecífica e outra específica (Siqueira & Rôças, 2005a; Gomes et al., 2007). Desta forma, esta abordagem parece ser mais acurada e favorece a detecção de espécies pouco abundantes em amostras endodônticas, como descrito previamente por Rôças *et al.* (2003a), Siqueira & Rôças (2003e), Foschi *et al.* (2005) e Gomes *et al.* (2007).

A alta frequência de detecção de treponemas em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais concorda com resultados reportados por Baumgartner *et al.* (2003), Rôças *et al.* (2006a) e Sakamoto *et al.* (2009). Embora os resultados indiquem que as espécies *T. socranskii* e *T. denticola* predominem em amostras de infecções endodônticas primárias associadas à sintomatologia dolorosa, Sakamoto *et al.* (2009) identificaram diversos clones pertencentes a esse grupo que não foram ainda caracterizados. As espécies de treponemas que colonizam a cavidade oral apresentam fatores de virulência que favorecem a sua participação na patogênese de diferentes lesões orais (Willis *et al.*, 1999), e são capazes de desestruturar os tecidos periapicais e dificultar a ação dos mecanismos de defesa do organismo (Scott et al., 1996). Associações estatísticas positivas foram detectadas entre os microrganismos *T. medium* - *T. vincentii* e entre a presença de *T. denticola* em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais. Baumgartner *et al.* (2003) e Rôças *et al.* (2006a) sugerem que a detecção simultânea de mais de um treponema em amostras de canais radiculares poderia induzir efeitos deletérios aos tecidos periapicais.

No presente estudo, a espécie mais frequentemente detectada em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais foi *T. socranskii*. Siqueira & Rôças (2003f) detectaram este microrganismo em apenas 5/20 amostras de abscessos periapicais agudos. Características celulares dos treponemas, como mobilidade, favorecem a invasão tecidual e dificultam a ação de macrófagos. *T. socranskii* produz ainda uma enzima que é capaz de degradar a substância amorfa do tecido conjuntivo (Scott *et al.*, 1996).

As espécies detectadas em amostras de canais radiculares foram detectadas também em abscessos periapicais. Entretanto, as espécies *T. denticola*, *T. medium* e *T. amylovorum* foram encontradas com maior frequência em amostras de abscessos periapicais. Os tecidos periapicais apresentam condições ambientais e recursos nutricionais mais ricos que o interior dos canais radiculares, favorecendo a infecção por treponemas. Entretanto, mesmo com o emprego de uma técnica sensível, as concentrações de DNA destas espécies poderiam se encontrar em níveis inferiores ao limite de detecção da técnica do Nested-PCR.

Observou-se associação positiva entre a presença de *T. denticola* no interior dos canais radiculares e nos abscessos periapicais. Baumgartner *et al.* (2003), Siqueira & Rôças (2004d) e Foschi *et al.* (2005) associaram esta espécie à presença de abscessos agudos e lesões periapicais crônicas. Nussbaum *et al.* (2009) relatam que *T. denticola* em monoinfecções induz reabsorções ósseas através de indução direta da expressão de citocinas ou pela estimulação de receptores através de seus lipopolissacarídeos ou proteínas de membrana. Foschi *et al.* (2006) relatam que *T. denticola* esteve freqüentemente associada a infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Poucos estudos relatam a presença de *T. maltophilum* e *T. pectinovorum* em infecções endodônticas (Rôças *et al.*, 2003a; Siqueira & Rôças, 2003e; Siqueira & Rôças, 2004d). A espécie *T. maltophilum* foi detectada em apenas uma amostra de canal radicular e não foi detectada em amostras de abscesso periapical, concordando com os achados de Siqueira & Rôças (2004d). *T. pectinovorum* não foi detectada nas amostras estudadas. Em canais radiculares, Rôças *et al.* (2003a) relatam uma baixa incidência desta espécie, que ocorreu em apenas 9,4% dos casos. Entretanto, Siqueira & Rôças (2004d) observaram esta espécie em 21% das amostras de abscessos periapicais estudados. Embora baixos níveis de detecção estejam associados a esta espécie, o seu potencial patogênico necessita ser elucidado. Em um estudo onde fibroblastos gengivais humanos foram expostos a diferentes espécies de

treponemas, Nixon *et al.* (2000) observaram que as células mortas de *T. pectinovorum* foram capazes de duplicar a produção dos mediadores inflamatórios IL-6 e IL-8.

A detecção simultânea de *Treponema* spp. em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais sugere o potencial destas espécies em burlar o sistema de defesa do organismo e se estabelecer em infecções dos tecidos periapicais.

Bactérias do gênero *Enterococcus* spp. constituem parte da microbiota indígena do trato gastro-intestinal e podem causar patologias de difícil manejo clínico, pois têm demonstrado altos índices de resistência (Davies *et al.*, 1973; Strohl *et al.*, 2004; Paterson, 2006). A sua ocorrência nos ecossistemas da cavidade oral pode ser modulada por fatores como a ingestão de alimentos tais como queijos e a presença de dentes com insucesso no tratamento endodôntico (Engström, 1964; Sedgley *et al.*, 2004; Razavi *et al.*, 2007).

No presente estudo, *E. faecalis* foi isolado através de cultura microbiana em um canal radicular, e detectado em outro caso através das técnicas de PCR e Nested-PCR, não sendo observado em amostras de exsudatos de abscessos periapicais agudos. As baixas taxas de detecção em infecções endodônticas primárias foram confirmadas por Siqueira *et al.* (2002b). Entretanto, Gomes *et al.* (2006b), empregando Nested-PCR, detectaram o microrganismo em 82% das amostras de canais radiculares. Resultados similares foram observados por Foschi *et al.* (2005), quando 60% dos casos de infecções primárias que não demonstravam sintomas clínicos de origem endodôntica apresentavam *E. faecalis*. Os perfis distintos das infecções endodônticas, como a presença ou ausência de sintomatologia dolorosa, podem explicar as diferentes taxas de detecção o microrganismo. Foschi *et al.* (2005) estabeleceram uma correlação positiva com casos de periodontite apical crônica.

Fatores de ordem local tais como contaminação através do manuseio de instrumentos endodônticos, isolamento absoluto não-adequado ou falha no

selamento coronário entre as sessões (Cheung *et al.*, 2001; Haapasalo *et al.*, 1983) podem favorecer o isolamento de *E. faecalis* em amostras clínicas. Dessa forma, o tipo de infecção e os cuidados com a assepsia do campo operatório e dos instrumentais empregados na terapêutica endodôntica e a adequada desinfecção das mucosas previamente a punção para coleta dos exsudatos periapicais justificam a baixa incidência desses microrganismos no presente estudo.

A técnica de PCR demonstrou ser mais sensível para a detecção dos microrganismos anaeróbios estritos *P. endodontalis*, *P. nigrescens*, *F. alocis*, *T. forsythia* e *P. tanneriae*. Um baixo índice de concordância na detecção das espécies foi observado para as técnicas de cultura microbiana e PCR. Moraes *et al.* (2002) estudaram a presença do microrganismo *F. nucleatum* em amostras de canais radiculares e relataram que não houve concordância entre os métodos de cultura microbiana, PCR e Hibridização DNA-DNA para a sua detecção.

A presença de microrganismos observada no método de PCR e ausência de isolamento através de cultura em uma mesma amostra pode ser justificada pelo número de células presentes e pela viabilidade das mesmas. Enquanto que a sensibilidade de detecção do método de cultura é de aproximadamente 10^4 a 10^5 células microbianas para uma determinada espécie usando meios não seletivos, e 10^3 usando meios seletivos, o PCR varia de 10 a 10^2 células, dependendo da técnica usada. O Nested PCR, empregado no presente estudo, pode detectar espécies na presença de 10 células (Zambon & Haraszthy, 1995; Spratt 2004; Siqueira & Rôças, 2005a). Para que um microrganismo seja passível de cultivo, ele deve estar viável. Entretanto, os métodos moleculares podem detectar também células microbianas mortas, uma vez que se baseiam na presença ou ausência do gene 16S rRNA (Siqueira & Rôças, 2005a).

A presença de uma espécie microbiana demonstrada através do método de cultura microbiana e a sua ausência de detecção através de um método mais sensível e específico, como PCR e Nested PCR pode estar

relacionada a limitações de identificação através dos métodos bioquímicos (Gomes *et al.*, 2005). Como exemplo, Woo *et al.* (2002) relatam que o teste bioquímico API 20A sugeriu a presença da espécie *A. naeslundii*, com um baixo índice de confiança (70%), e após o sequenciamento do gene 16S rRNA, o resultado obtido foi *Lactobacillus salivarius*.

6.3 SIMILARIDADE DE PERFIS MICROBIANOS EM AMOSTRAS DE CANAIS RADICULARES E EXSUDATOS PERIAPICAIS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS SINTOMÁTICAS

A análise de clusters ou agrupamento tem sido utilizada para relacionar amostras de acordo com a sua similaridade, originando padrões de comunidades microbianas que podem ser associados à determinada condição clínica (Gafan *et al.*, 2005). Através deste método, Machado de Oliveira *et al.* (2007) compararam a microbiota de amostras de abscessos periapicais agudos obtidas nos Estados Unidos e no Brasil, Siqueira *et al.* (2008b) avaliaram a similaridade de amostras obtidas na Noruega e no Brasil, e Saito *et al.* (2009) observaram a relação das comunidades microbianas em infecções primárias sintomáticas ou assintomáticas.

Os resultados do presente estudo indicaram que a maioria das amostras de canais radiculares e abscessos periapicais apresentam perfis microbianos individualizados, com baixo nível de agrupamento, concordando com os relatos de Machado de Oliveira *et al.* (2007). Este comportamento é diferente daquele observado em situação de saúde. Costello *et al.* (2009) relataram que as comunidades microbianas presentes na cavidade oral de pacientes saudáveis são bastante similares, tanto em sítios de um mesmo indivíduo, quanto em indivíduos diferentes. Zaura *et al.* (2009) ressaltam ainda que um “núcleo central” de espécies parece ser comum na cavidade oral de indivíduos saudáveis.

No presente estudo observou-se uma heterogeneidade na composição das comunidades microbianas em infecções relacionadas de um mesmo indivíduo

e entre os indivíduos. Siqueira *et al.* (2008b) relataram que, independentemente da localização geográfica, há uma grande variação no padrão de agrupamento das amostras e a maioria dos clusters apresentaram uma mistura de amostras dos dois países. Saito *et al.* (2009) sugerem que características clínicas relacionadas à dor de origem endodôntica não são produzidas por um único consórcio ou cluster específico de espécies. Assim, os resultados do presente trabalho confirmam a hipótese de que mais de um perfil microbiano pode estar associado ao desenvolvimento de infecções agudas em canais radiculares e abscessos periapicais, em ecossistemas vizinhos e relacionados. Os microrganismos encontram-se associados em comunidades complexas e a presença de sinais e sintomas específicos parece ser resultado de interações entre todos seus membros, independente de sua abundância.

6.4 SUSCETIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

O sistema do E-test é um método de fácil realização, e desde sua introdução (Citron *et al.*, 1991; Briñas *et al.*, 2002) tem sido observada uma popularização de seu uso tanto por laboratórios institucionais quanto privados (Goldstein *et al.*, 1992; Goldstein *et al.*, 1995; Goldstein *et al.*, 2008). Este método traz resultados relevantes quanto à suscetibilidade antimicrobiana, pois ao utilizar-se de microrganismos viáveis, permite a expressão dos fatores de virulência bacterianos relacionados à resistência. A detecção da presença do gene relacionado, por si só, pode não corresponder a sua atividade, pois vários fatores são capazes de regular sua expressão (Madigan *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos através do E-test permitem verificar as concentrações que inibem o crescimento de 50% e de 90% das cepas (CIM₅₀ e CIM₉₀) além de demonstrar o intervalo de variação dos valores máximos e mínimos de CIM para cada cepa. De forma indireta, esses dados permitem

comparações com estudos prévios, e alterações significativas podem sugerir a diminuição da sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados. Ao estudarem microrganismos isolados de infecções endodônticas de uma mesma região, em períodos diferentes, Sousa (2003) e Montagner (2009) observaram alterações nos valores de CIM para alguns agentes antimicrobianos. Sousa (2003) relatou que 100% das cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens* foram sensíveis à clindamicina e a CIM₉₀ foi de 0.125. Montagner (2009) observou que todas as cepas desta espécie foram também sensíveis à clindamicina, no entanto, o valor de CIM₉₀ alterou-se para 0.75, aproximando-se ainda mais do valor limite de suscetibilidade. Demonstrou-se um aumento dos valores de concentração inibitória mínima necessários para inibir o crescimento de 90% das cepas.

Os resultados indicam que 45% dos pacientes selecionados para o estudo apresentam microrganismos resistentes a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados. Estudos epidemiológicos demonstram uma emergência da resistência microbiana em todo o mundo (Chan & Chan, 2003; Al-Haroni & Skaug, 2007), constatada pela alteração nos padrões de suscetibilidade das cepas aos fármacos. Embora a resistência bacteriana possa ser superada com o emprego e a fabricação de novos fármacos (Medeiros, 1997; Handal & Olsen, 2000; Babic *et al.*, 2006), é importante o conhecimento das características da infecção a ser tratada, permitindo assim prescrições com espectros de ação, doses, frequências e duração adequados.

Amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e penicilina G foram os agentes antimicrobianos mais efetivos frente aos isolados de canais radiculares e abscessos periapicais, seguidos de clindamicina e metronidazol. Os maiores níveis de resistência foram observados para eritromicina e azitromicina. As cepas isoladas de canais radiculares demonstram valores superiores de CIM para amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, azitromicina e metronidazol quando comparadas àquelas isoladas de abscessos periapicais.

As penicilinas são as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções orofaciais. A penicilina G é uma penicilina natural e foi empregada neste estudo como padrão de comparação. Este antibiótico não é freqüentemente prescrito em Odontologia, pois é aplicado através de injeção intramuscular. A Penicilina G é pouco absorvida quando administrada via oral, pois é degradada pelo suco gástrico, sendo a Penicilina V a forma de escolha para administração oral (Groppo *et al.*, 2006). Ainda, no Brasil a penicilina V é que é apenas encontrada comercialmente em comprimidos de 500.000 UI (DEF 2005/2006), o que equivale à sub-dose de 325 mg (Groppo *et al.*, 2006).

No Brasil, a amoxicilina tem sido rotineiramente prescrita como coadjuvante para o tratamento de infecções orofaciais em pacientes que não apresentam reações alérgicas a esse medicamento. Seu uso clínico está relacionado as suas características de biodisponibilidade, tais como rápida absorção pelo organismo e manutenção prolongada de níveis séricos, permitindo intervalos de administração mais longos (Montgomery, 2000).

A administração de amoxicilina associada ao ácido clavulânico não deve ser rotineiramente empregada no manejo das infecções orofaciais. Esta associação deve ser utilizada apenas quando não há uma resposta adequada às medidas locais para o tratamento de urgência associado a um antibiótico β -lactâmico ou quando se detectou em testes laboratoriais a presença de bactérias produtoras de lactamases (Jacinto *et al.*, 2008).

A efetiva ação do metronidazol frente a microrganismos anaeróbios tem sido freqüentemente relatada (Kuriyama *et al.*, 2000; Letornel-Gloumaud *et al.*, 2003; Sousa, 2003; Jacinto, 2007). Em amostras de canal radicular, 100% das cepas do gênero *Prevotella* foram suscetíveis ao fármaco, contrariando os 75% observados em amostras de abscessos periapicais. Comportamento oposto foi verificado para as cepas de *Porphyromonas* e *Peptostreptococcus*, onde uma maior suscetibilidade é observada nas amostras de abscessos periapicais. Como as infecções endodônticas são mistas e abrigam também microrganismos

facultativos, clinicamente o emprego isolado do metronidazol não se mostra efetivo, necessitando associação com antibióticos β -lactâmicos (Baumgartner & Xia, 2002; Jacinto *et al.*, 2008).

A clindamicina é a droga de terceira-escolha para o tratamento de infecções odontogênicas que não respondem de maneira favorável aos beta-lactâmicos (Montgomery, 2000). Seu espectro de ação é bastante amplo frente aos anaeróbios estritos (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996; Chan & Chan, 2003; Kuriyama *et al.*, 2007), dentre eles os Gram-negativos, especialmente os bacilos produtores de pigmento negro (Kuriyama *et al.*, 2000).

No presente estudo, todas as cepas de *Prevotella* pigmentadas e não-pigmentadas, *Porphyromonas* e *Peptostreptococcus* foram sensíveis à clindamicina, exceto 37,5% das cepas de *Prevotella* não-pigmentadas isoladas de abscessos periapicais. Eik *et al.* (1999) demonstraram uma pequena taxa de resistência das *Prevotella* não-pigmentadas à clindamicina. Alta suscetibilidade das cepas isoladas de abscessos periapicais à clindamicina também foi reportada por Kuriyama *et al.* (2000) e Kuriyama *et al.* (2007). Os autores relatam que 100% das cepas de *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. isoladas de abscessos periapicais resistentes à penicilina G são suscetíveis à clindamicina. Sousa (2003) e Jacinto (2007) observaram altas taxas de suscetibilidade bacteriana à clindamicina. Relatos de Lõivukene & Naaber (2003) indicam uma tendência ao surgimento de resistência a esse fármaco para a amostra avaliada. A expressão dos genes *ermF* e *ermG* são determinantes para o surgimento de resistência microbiana à clindamicina (Hecht, 2006), pois este fármaco consegue atingir concentrações teciduais elevadas, tanto em tecido ósseo quanto em abscessos (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996).

Eritromicina, azitromicina e clindamicina são prescritas para pacientes que apresentam alergia aos antibióticos do grupo das penicilinas (Groppo *et al.*, 2006). Kuriyama *et al.* (2000) e Chan & Chan (2003) relataram um aumento na incidência de resistência à eritromicina. Para as espécies pertencentes ao gênero

Prevotella, há uma maior porcentagem de cepas sensíveis à eritromicina em canais radiculares, o que não é observado para as espécies de *Peptostreptococcus* e *Porphyromonas* isoladas neste mesmo ecossistema.

Modificações na estrutura química da eritromicina permitiram a síntese da azitromicina, que apresenta um espectro de ação e meia-vida plasmática ampliados (Kapusnik-Uner *et al.*, 1996), sendo empregada como alternativa aos lactâmicos na profilaxia para endocardite bacteriana em pacientes suscetíveis (Montgomery, 2000). O perfil de suscetibilidade dos isolados de canais radiculares e abscessos periapicais à eritromicina e azitromicina é variável. Todas as *Prevotella* spp. pigmentadas e ou não, e as *Porphyromonas* de isoladas de canais radiculares foram suscetíveis à azitromicina. Uma maior resistência a esse fármaco foi observada para 75% dos isolados de abscessos periapicais agudos, pertencentes às *Prevotella* não-pigmentadas.

O curto período de emprego da azitromicina e seu espectro de ação o tornam um fármaco de grande interesse para a comunidade médico-odontológica. No entanto, o *Clinical and Laboratory Standard Institute* – CLSI (2007) não determinou valores específicos para a determinação de resistência ou sensibilidade das cepas. Resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* da azitromicina têm demonstrado sua ineficácia frente a microrganismos anaeróbios (Herrera *et al.*, 2000). Em testes laboratoriais, Merriam *et al.* (2006) observaram que mesmo pequenas variações no pH do meio de cultura causaram alterações significativas nos resultados de E-test para uma mesma cepa. Estudos clínicos são necessários para que ocorra uma validação dos valores de corte interpretativos para determinação de sensibilidade e resistência a estes macrolídeos.

Todas as cepas de *Prevotella* produtoras de pigmento negro isoladas de canais radiculares e abscessos periapicais foram sensíveis à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina e azitromicina. Entretanto, alguns isolados de abscessos periapicais demonstraram resistência à penicilina G,

eritromicina e ao metronidazol. Schumacher *et al.* (1999) relatam uma baixa resistência deste grupo aos beta-lactâmicos e suas associações ao ácido clavulânico. Bernal *et al.* (1998) constataram que as cepas de *Prevotella nigrescens* estiveram mais freqüentemente relacionadas à produção de β -lactamases quando comparadas à cepas de *Prevotella intermedia*. Em estudo recente, Kuriyama *et al.* (2007) relata um aumento da incidência de cepas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos em amostras de abscessos periapicais.

Os isolados de canais radiculares pertencentes ao gênero *Prevotella* não-pigmentadas foram mais resistentes à penicilina G que os dos abscessos periapicais. Kolokotronis (1999) demonstrou que um número cada vez maior de isolados clínicos pertencentes a este gênero é capaz de produzir β -lactamases. De acordo com Handal & Olsen (2000), o mecanismo de resistência está relacionado à presença do gene *cfx-A* responsável pela produção de beta-lactamases. Kuriyama *et al.* (2000) relataram que a produção de β -lactamases em *Prevotellas* não-pigmentadas é superior àquela observada para *Prevotella* pigmentadas. *Prevotella* não-pigmentadas isoladas de abscessos periapicais foram 100% suscetíveis aos antibióticos beta-lactâmicos, e demonstraram níveis inferiores de resistência frente à penicilina G, quando comparadas às isoladas de canais radiculares. Todos os isolados de canais radiculares foram suscetíveis à clindamicina, eritromicina, azitromicina e metronidazol, porém algumas cepas isoladas de abscessos periapicais demonstraram resistência a esses fármacos.

Observou-se que os isolados pertencentes ao gênero *Peptostreptococcus* dos abscessos periapicais foram mais suscetíveis à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, azitromicina e metronidazol. Kuriyama *et al.* (2007) indicaram que clindamicina, eritromicina e metronidazol foram efetivos frente a *Peptostreptococcus* spp. isolados de abscessos periapicais agudos. Martinho (2007) relatou uma pequena taxa de resistência de *P. micra* à amoxicilina. De maneira geral, espécies Gram-positivas são bastante suscetíveis aos antibióticos lactâmicos (Groppo *et al.*, 2006; Hecht, 2006).

Porphyromonas spp. isoladas de canais radiculares demonstraram resistência à penicilina G (50%), eritromicina (25%) e metronidazol (25%). Todos os microrganismos pertencentes a este gênero isolados de abscessos periapicais foram suscetíveis à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, azitromicina e metronidazol. Jacinto *et al.* (2003) relata que 100% das cepas de bactérias produtoras de pigmento negro foram sensíveis à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e eritromicina, enquanto que valores inferiores foram observados para clindamicina e metronidazol.

Dentre os microrganismos anaeróbios estritos estudados, as cepas de *Fusobacterium necrophorum* demonstraram ser suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. Uma cepa de *F. nucleatum* isolada de canais radiculares foi resistente a todos antimicrobianos. Características intrínsecas relacionadas a esta cepa podem ser os responsáveis por tal resultado, pois Hecht (2006) relatou que os antibióticos β -lactâmicos são efetivos frente a *Fusobacterium* spp. e a produção de lactamases é rara. Babic *et al.* (2006) sugerem ainda mecanismos adicionais de resistência, tais como a diminuição da afinidade dos receptores das células bacterianas e a restrição da entrada do antibiótico para o interior celular. Sousa (2003), Jacinto (2007), Kuriyama *et al.* (2007), Jacinto *et al.* (2008) relataram níveis superiores de suscetibilidade dessa espécie aos agentes antimicrobianos, quando isolada de canais radiculares.

Segundo van Winkelhoff *al.* (2005) e Hawkey (2008), variações entre os resultados descritos em diferentes estudos podem estar relacionadas à metodologia empregada, época de sua realização, localização geográfica ou o número de amostras estudadas. Apesar do limitado número de cepas analisadas nessa pesquisa, os resultados demonstram uma diferença nas características de suscetibilidade dos isolados em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais de um mesmo paciente.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram avaliados microbiologicamente amostras de infecções endodônticas primárias sintomáticas obtidas de canais radiculares e de abscessos periapicais agudos, relacionadas a um elemento dental de um mesmo indivíduo. A literatura não apresenta relatos da descrição ampla da estrutura e da composição das comunidades microbianas em amostras pertencentes a ecossistemas relacionados, em Endodontia. A técnica da cultura, que demonstra a viabilidade das espécies na infecção, associada à análise de fragmentos de restrição, que detecta e quantifica microrganismos cultiváveis, não cultiváveis e ainda não cultivados, permitiram a construção de um painel, caracterizando de forma ampla a estrutura das comunidades microbianas. A amplificação de seqüências específicas de ácidos nucléicos (PCR e Nested-PCR) forneceu dados sobre a freqüência de microrganismos anaeróbios estritos fastidiosos, de difícil cultivo laboratorial ou que estão presentes em baixa concentração celular, inferior aos níveis passíveis de cultivo.

Observou-se a presença de comunidades distintas e únicas, tanto em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais, determinando perfis específicos. A alta dissimilaridade interindividual sugere que fatores locais relacionados ao hospedeiro, tanto extrínsecos (hábito de fumar) quanto intrínsecos, parecem ser determinantes para a seleção das espécies. As pressões seletivas impostas pelo ambiente exigem a organização microbiana em comunidades complexas, produzindo perfis composicionais diferenciados mesmo em amostras pareadas, de um mesmo indivíduo. Estudos adicionais são necessários para estabelecer as intrincadas relações entre as espécies. Estas, embora organizadas de maneira diferente, produzem a mesma condição clínica, caracterizada por necrose pulpar, dor espontânea e intensa, dor à percussão vertical e dor à palpação nos tecidos periapicais. A estrutura heterogênea das comunidades microbianas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos

pode ainda originar interações que se refletem em padrões não similares de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos mais prescritos em Endodontia.

A escolha das diferentes abordagens clínicas realizadas para o tratamento dos abscessos periapicais agudos envolve aspectos muitas vezes empíricos, baseados apenas na experiência profissional. Dentre elas, observam-se a prescrição isolada de agentes antimicrobianos, apenas desinfecção dos canais radiculares, ou desinfecção dos canais radiculares e drenagem cirúrgica. Há a necessidade de estudos que suportem a opção por uma determinada abordagem. Os resultados do presente estudo sugerem que os procedimentos clínicos que envolvem o controle da infecção aguda no sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais devem considerar a diferença composicional de ambas microbiotas. Idealmente, a abordagem clínica de ambos os ecossistemas deve ser realizada, favorecendo a resposta do sistema imune do hospedeiro e o reestabelecimento da saúde do indivíduo. Como exemplo, pode-se descrever o uso associado da descontaminação de toda a extensão dos canais radiculares, considerando que uma microbiota complexa é observada neste ecossistema principalmente no terço apical, e também a drenagem cirúrgica do exsudato periapical tanto na sua fase intra-óssea quanto na sua fase submucosa independente da existência ou não de um ponto de flutuação. Isto favorecerá a ação do sistema de defesas na região periapical, que é auxiliada pelo efeito dos agentes antimicrobianos, evitando a disseminação da infecção para espaços fasciais profundos, principalmente em infecções difusas, presença de febre, trismo e mal-estar.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e nas limitações experimentais do presente estudo, pode-se concluir que:

1. As comunidades microbianas nos canais radiculares e nos abscessos periapicais agudos são heterogêneas, tanto na sua composição quanto em sua estrutura, representados pelo número e diversidade de espécies, de acordo com as técnicas de cultura e polimorfismo do fragmento terminal de restrição;
2. As espécies anaeróbias estritas *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis*, *Treponema socranskii* e *Treponema denticola* foram freqüentemente detectados através de PCR e Nested-PCR em amostras de canais radiculares e abscessos periapicais agudos, ao contrário do microrganismo facultativo *Enterococcus faecalis*;
3. As amostras de canais radiculares e abscessos periapicais obtidas de um mesmo ou de diferentes pacientes apresentaram baixo nível de agrupamento, confirmando a presença de perfis individualizados que estão associados às infecções endodônticas primárias sintomáticas, quando foram considerados os métodos de cultura microbiana, PCR e Nested-PCR;
4. Isolados de canais radiculares demonstraram maior resistência aos antimicrobianos que os isolados de abscessos periapicais, sendo a amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e penicilina G os agentes mais efetivos, mesmo não tendo inibido o crescimento de todas as bactérias testadas.

REFERÊNCIAS

1. Aderholt L, Knothe H, Frenkel G. The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. *Oral Surg.* 1981; 52(6): 583-7.
2. Akiyama K, Taiyasu N, Hirota J, Iba Y. Recurrent aortic valve endocarditis caused by *Gemella morbillorum* – report of a case and review of the literature. *Jap Circ J.* 2001; 65(11): 997-1000.
3. Alekshun MN, Levy SB. Commensals upon us. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71(7): 893-900.
4. Al-Haroni M, Skaug N. Incidence of antibiotic prescribing in dental practice in Norway and its contribution to national consumption. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(6): 1161-1166.
5. Andrade ED, Souza-Filho FJ. Protocolos Farmacológicos em Endodontia. In: Andrade ED, organizador. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia.* 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006. p. 169-178.
6. Avaniss-Aghajani E, Jones K, Holtzman A, Aronson T, Glover N, Boian M, Froman S, Brunk C. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996; 34(1): 98-102.
7. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drugs Resist Updat;* 2006; 9(3): 142-156.
8. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 1997; 23(10): 620-3.
9. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29(12): 794-7.

10. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae K-S, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999; 25(6): 413-415.
11. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod.* 2002; 29(1): 44-47.
12. Berber VB. Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao preparo químico-mecânico e medicações intra-canais entre sessões de atendimento [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
13. Berg JO, Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res.* 1973; 81(2): 163-6.
14. Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odont Revy.* 1974; 25(4): 347-358.
15. Bernal LA, Guillot E, Paquet C, Moutoun C. β -lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13(1): 36-40.
16. Birn H. Spread of dental infections. *Dental Practitioner and Dental Record.* 1972; 22(9): 347-56.
17. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1999. 32(3): 204-210.
18. Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with E-test. *Clin Infect Dis.* 1993; 16 (Suppl4): S367-70.
19. Boykin MJ, Gilbert GH, Tilashalski KR, Shelton BJ. Incidence of endodontic treatment: a 48-month prospective study. *J Endod;* 2003. 29(12): 806-9.

20. Briñas L, Zarazaga M, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. β -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agent Chemoth.* 2002; 46(10): 3156-3163.
21. Brook I, Frazier EH, Bher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6(2): 123-5.
22. Brook I, Frazier EH, Gher ME Jr. Microbiology of periapical abscesses and associated maxillary sinusitis. *J Periodontol.* 1996; 67(6): 608-10.
23. Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *Journal of Endodontics.* 1981; 7(8): 378-80.
24. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(1): 177-207.
25. Brown LR, Rudolph CE. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957; 10(10): 1094-1099.
26. Burnham R, Bhandari R, Bridle C. Changes in admission rates for spreading odontogenic infection resulting from changes in government policy about the dental Schedule and remunerations. *Br J Oral Maxillof Surg.* 2010. *In press.*
27. Campanelli C, Walton RE, Williamson AE, Drake DR, Qian F. Vital signs of the emergency patient with pulp necrosis and localized acute apical abscess. *J of Endod.* 2008; 34(3): 264-267.
28. Carter L, Lewis E. Death from overwhelming odontogenic sepsis: a case report. *Br Dent J.* 2007; 203(5): 241-242.
29. Carvalho FLQ. Lincosamidas, Tetraciclina e Cloranfenicol. In: Silva P. *Farmacologia* (organizador). 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 1021-1031.

30. Carvalho RDS, Carvalho WA. Eritromicina, azitromicina e claritromicina. In: Silva P (organizador). Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2002. p. 1015-1020.
31. Chambers HF, Sande MA. Fármacos antimicrobianos. In: Goodman & Gilman A (organizadores). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9. ed. Santiago: McGraw-Hill. 1996. p. 757-776.
32. Chan Y, Chan C-H. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003; 36(2): 105-110.
33. Chastre J. Evolving problems with resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(Suppl 3): 3-14.
34. Chaves M. Odontologia Social. 3 ed. São Paulo: Artes Médicas. 1986.
35. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal – treated teeth associated with asymptomatic periapical radioluscent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16(6): 332-337.
36. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein AJC. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(10): 2197-2203.
37. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): 840-62.
38. Collins LMC, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res.* 1987; 66(8): 1300–1302.

39. Conrads G, Soffner J, Pelz K, Mutters R. Taxonomic update and clinical significance of species within the genus *Peptostreptococcus*. *Clin Infect Dis*. 1997; 25(Supl.2): S94-97.
40. Costa Filho AS. Diagnóstico em Endodontia. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia – Biologia e Técnica*. 2 ed. 2004. Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan. p. 101-19.
41. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009; 326(6): 1694-1697.
42. Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontology 2000*. 2002; 28(1): 206-39.
43. Dahllöf I. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13(3): 213-7.
44. Davies BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB. *Microbiologia – Infecções Bacterianas e Micóticas*. 1. ed. Edart: São Paulo. 1973. 415p.
45. DEF 2005/2006 – Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. *Jornal Brasileiro de Medicina*. São Paulo:Editora de Publicações Científicas. 2005. 930p.
46. Dickie IA, FitzJohn RG. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*. 2007; 17(4): 259-70.
47. Dickie IA, Xu W, Koide RT. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soils as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol*. 2002; 156(3): 527-35.
48. Dodson TB, Perrott DH, Kaban LB. Pediatric maxillofacial infections: a retrospective study of 113 patients. *J Oral Maxillof Surg*. 1989; 47(4): 327-30.

49. Dorland WA. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 1994. Philadelphia, PA, USA: W.B. Saunders Company. 1994.
50. Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod*. 1998; 24(5): 356-8.
51. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(3): 537-42.
52. Eik S, Pfister W, Straube E. Antimicrobial susceptibility of anaerobic and capnophilic bacteria isolated from odontogenic abscesses and rapidly progressive periodontitis. *Int J Antimicrob Agents*. 1999; 12(1): 41-46.
53. Ellner PD, Granato PA, May CB. Recovery and identification of anaerobes: a system suitable for the routine clinical laboratory. *Appl Microbiol*. 1973; 26(6): 904-913.
54. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy*. 1964; 15(2): 87-106.
55. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*. 2004; 56(3): 297-314.
56. Finegold SM. Host factors predisposing to anaerobic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993; 6(2-3):159-164.
57. Flynn TR, Shanti RM, Levi MH, Adamo AK, Kraut RA, Trieger N. Severe odontogenic infections, Part 1: Prospective Report. *J Oral Maxillof Surg*. 2006; 64(7): 1093-1103.
58. Flynn TR. The swollen face: severe odontogenic infections. *Emerg Med Clin North Am*. 2000; 18(3): 481-519.

59. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(5): 289-295.
60. Foschi F, Izard J, Sasaki H, Sambri V, Prati C, Müller R, Stashenko P. *Treponema denticola* in dissemination endodontic infections. *J Dent Res* 2006; 85(8): 761-5.
61. Fullmer SC, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res.* 2009. 88 (6): 524-8.
62. Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA. Statistical analyses of complex denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 3971–3978.
63. Geddes AM, Klugman KP, Rolinson GN. Introduction: Historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 30 (Suppl 2): S109-12.
64. Gharbia SE, Shah HN. Interactions between black-pigmented Gram-negative anaerobes and other species which may be important in disease development. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1993; 6(2-3): 173-178.
65. Goldstein EJ, Citron DM, Goldman PJ, Goldman JR. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. *Anaerobe.* 2008; 14(2): 68-72.
66. Goldstein EJ, Citron DM, Goldman RJ, Claros MC, Hunt-Gerrado S. United States national hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods, II. *Anaerobe.* 1995; 1(6): 309-314.

67. Goldstein EJ, Citron DM, Goldman RJ. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility testing methods: results and recommendations for improvement. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6): 1529-1534.
68. Gomes BP. Microrganismos: quais são, onde estão, que danos causam? In: *Endodontia/Trauma.* São Paulo: Artes Médicas. 476p.
69. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994a; 27(6): 291-298.
70. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios.* 1994b; 80(325): 365-377.
71. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(4): 211-215.
72. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006a. 32 (10): 937-940.
73. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996; 29(2): 69-75.
74. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(4): 519-25.

75. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. J Endod. 2007; 33(9): 1049-52.
76. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19(2): 71-6.
77. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and polymerase chain reaction analysis. Oral Med Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006b; 102(2): 247-253.
78. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. Infect Immun 1986;53:616-20.
79. Griffe MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980; 50(5): 457-461.
80. Groppo FC, Del Fiol FS, Andrade ED. Profilaxia e tratamento das infecções bacterianas. In: Andrade ED (organizador). Terapêutica Medicamentosa em Odontologia. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006. p. 61-93.
81. Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. Journal of Endodontics. 2009. 35(12): 1658-74.
82. Haapasalo MPP, Ranta H, Ranta KT. Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. Acta Odontol Scand. 1983; 41(1): 19–22.
83. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. Infect Immun. 1986; 53(1): 149-153.

84. Haapasalo M. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1993; 6(2-3): 213-8.
85. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(11): 996–1002.
86. Handal T, Olsen I. Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(3):163-174.
87. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod.* 1992; 18(11): 558-561.
88. Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62 (Suppl 1): i1-i9.
89. Hecht DW, Vedantam G, Osmolski JR. Antibiotic resistance among anaerobes: what does it mean? *Anaerobe.* 1999; 5: 421-429.
90. Hecht DW. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe.* 2006; 12(3): 115-121.
91. Heimdahl A, Von Konow L, Nord CE. Isolation of β -lactamase-producing *Bacteroides* strains associated with clinical failures with penicillin treatment of human orofacial infections. *Arch Oral Biol.* 1980; 25(10): 689-692.
92. Henson PM, Johnston RB. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest.* 1987; 79(3): 669–74.
93. Herrera D, Roldan S, Sanz M. The periodontal abscess: a review. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(6): 377-86.
94. Hommeez GMG, Verhelst R, Vaneechoutte M, Claeys G, De Moor RJG. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the microflora

- in necrotic teeth of patients irradiated in the head and neck region. *J Endod* 2008; 34(9): 1048-51.
95. Huag RH, Hoffman MJ, Indresano AT. An epidemiologic and anatomic survey of odontogenic infections. *J Oral Maxillof Surg.* 1991; 49(9): 97-80.
 96. Ide L, Lotufo RFM, Contreras A, Bergamashi O, Slots J. Occurrence of seven putative periodontal pathogens in the subgingival plaque of two native populations in the Xingu Indian Park. *Anaerobe.* 2000. 6(n): 135–7.
 97. Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendram D, Shah HN. Bacterial examintaion of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 403-10.
 98. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt8): 777-83.
 99. Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(5): 285-292.
 100. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006; 39(1): 62-70.
 101. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod.* 2008; 34(12): 1451-1456.

102. Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49(Pt4):1375–9.
103. Jawetz E. Antimicrobial chemotherapy. Ann Rev Microbiol. 1956; 10(...): 85-114.
104. Jensen MS, Bainton DF. Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic Leukocyte. J Cell Biol. 1973; 56(2): 379–88.
105. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965; 20(n): 340-349.
106. Kannangara DW, Thadepalli H, McQuirter JL. Bacteriology and treatment of dental infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980; 50(2): 103-9.
107. Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Fármacos antimicrobianos – tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e outros fármacos antibacterianos. In: Goodman & Gilman (organizadores). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9. ed. Santiago: McGraw-Hill. 1996; p. 827-848.
108. Karchmer AW, Moellering Jr RC, Maki DG, Swartz MN. Single antibiotic therapy for streptococcal endocarditis. JAMA. 1979; 241(17): 1801-1806.
109. Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. J Endod. 1976; 2(5): 146-8.
110. Khemaleelakul S, Baumgartner C, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94(6): 746-755.

111. Kolokotronis A. Beta-lactamase producing anaerobic bacteria in dentoalveolar abscesses. *J Oral Sci.* 1999; 41(4): 187-90.
112. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido.* 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.
113. Krall EA, Abreu Sosa C, Garcia C, Nunn ME, Caplan DJ, Garcia RI. Cigarette smoking increases the risk of root canal treatment. *J Dent Res* 2006; 85:313-7.
114. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 3944-55.
115. Kuriyama T, Nakagawa K, Karasawa T, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Past administration of beta-lactamase-producing bacteria in patients with orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 89(2): 186-192.
116. Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, Yamamoto E, Karasawa T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infections to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(4): 285-8.
117. La Scola B, Raoult D. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(4): 866-71.
118. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MAR, Farias LM. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16(2): 100-105.

119. Leonardo RT, Lia RCC. Semiologia e diagnóstico clínico/radiográfico das alterações periapicais de origem inflamatória. In.: Leonardo MR. Endodontia: Tratamento de Canais Radiculares – Princípios técnicos e biológicos. Volume 1. 2005. São Paulo: Artes Médicas. p. 67-98.
120. Letournel-Gloumaud C, Houssaye S, Milhailha L, Ghnassia JC. E-test antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria. *Anaerobe*. 2003; 9(6): 281-4.
121. Lewis MA, MacFarlane TW, McGowan. Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. *J Med Microbiol*. 1986; 21(2): 101-4.
122. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(11): 4516-22.
123. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP *et al*. *Biologia celular e molecular*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
124. Lõivukene K, Naaber P. Antibiotic susceptibility of clinically relevant anaerobes in Estonia from 1999 to 2001. *Anaerobe*. 2003; 9(2): 57-61.
125. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*. 2000; 163(3): 301-9.
126. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS, Rosado AS. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazil and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(1):14-18.
127. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall; 2004.
128. Markham AF. The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. *BMJ*. 1993; 306(6875): 441-6.

129. Marsh TE. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2(3): 323-7.
130. Martinho FC. Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.
131. Mayer SJ, Keen PM, Craven N, Bourne FJ. Regulation of phagolysosome pH in bovine and human neutrophils: the role of NADPH oxidase activity and an Na⁺/H⁺ antiporter. *J Leuk Biol.* 1989; 45(3): 239–48.
132. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 1997; 24 (Suppl1): 19-45.
133. Merriam CV, Citron DM, Tyrrell KL, Warren YA, Goldstein EJ. *In vitro* activity of azithromycin and nine comparator agents against 296 strains of oral anaerobes and 31 strains of *Eikenella corrodens*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 28(3): 244-8.
134. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria - Approved Standard (M11-A7). Clinical and Laboratory Standards Institute. 7. ed., 2007, 27(2).
135. Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981; 89(6): 475:484.
136. Montagner F. Identificação microbiológica em dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e a suscetibilidade antimicrobiana de algumas bactérias anaeróbias estritas isoladas [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.

137. Montgomery EH. Antibióticos antibacterianos. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ (organizadores). Farmacologia e Terapêutica para Dentistas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 468-502.
138. Moraes SR, Siqueira JF Jr, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. J Endod. 2002; 28(2): 86-89.
139. Morse DR. Endodontic microbiology in the 1970's. Int Endod J. 1981; 14(2): 69-79.
140. Morse DR. Endodontic flare-ups: prevention and treatment. Hawaii Dent J. 1987; 18(11): 10-13.
141. Mullis KB. The polymerase chain reaction – Nobel Prize Lecture, 1993 [acesso 2009 Jul 10]. Disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullislecture.html
142. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262(4): 56-65.
143. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res. 2002; 81:761-6.
144. Nair PR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod. 1987; 13(1): 29-40.
145. Nair PR. Patobiologia da Periodontite Apical Primária. In.: Cohen S, Hargreaves KM. Caminhos da Polpa. 9 ed. 2007. Rio de Janeiro: Elsevier.

146. Nixon CS, Steffen MJ, Ebersole JL. Cytokine responses to *Treponema pectinovorum* and *Treponema denticola* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun*. 2000; 68(9): 5284-92.
147. Nussbaum G, Ben-Adi S, Genzler T, Sela M, Rosen G. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infect Immun* 2009; 77(9): 3939–47
148. Obayashi N, Arijji Y, Goto M, Izumi M, Naitoh M, Kurita K, Shimozato K, Arijji E. Spread of odontogenic infection originating in the maxillary teeth: computerized tomographic assesstment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004. 98 (2): 223-31.
149. Oguntebi B, Slee AM, Tanzer M, Lageland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscess. *J Clin Microbiol*. 1982; 15(5): 964-6.
150. Okayama H, Nagata E, Ito HO, Oho T, Inoue M. Experimental abscess formation caused by human dental plaque. *Microbiol Immunol* 2005; 49(5): 399-405.
151. Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata RJr, Andrade AFB. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals 16S r-RNA gene directed polymerase chain reaction. *J. Endod*. 2000; 26(12): 729-732.
152. Owens Jr RC. An overview of harms associated with β -lactam antimicrobials: where do the carbapenems fit in? *Crit Care*. 2008a; 12(Suppl 4): 1-11.
153. Owens Jr RC, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 15(Suppl 1): 19-31.

154. Ozbek SM, Ozbek A, Edrogan AS. Detection of *Treponema denticola* in symptomatic apical periodontitis and symptomatic apical abscesses by Real-Time PCR. *Eur J Dent.* 2009; 3(2): 107-113.
155. Palmer NOA, Martin MV, Pealing R, Ireland RS. An analysis of antibiotic prescriptions from general dental practitioners in England. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(6): 1033-1035.
156. Pappa H, Jones DC. Mediastinitis from odontogenic infection. A case report. *British Dental Journal.* 2005. 198(9): 547-8.
157. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183(12): 3770-3783.
158. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control.* 2006; 34(5 Suppl 1): S20-8.
159. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combination of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J.* 2002; 35(8): 698-702.
160. Peterson LJ. Princípios de prevenção e tratamento de infecções odontogênicas. In: Peterson LJ. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea.* 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. p.367-389.
161. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1): 1-11.
162. Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontites. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7(1): 1-6.
163. Razavi A, Gmür F, Imfeld T, Zehnder M. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(4): 248-51.

164. Reit C, Petersson K, Molven O. Diagnóstico das doenças pulpares e periapicais. In: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C. Endodontia. 2006. Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan. p. 9-18.
165. Riggio MP, Aga H, Murray CA, Jackson MS, Lennon A, Hammersley N, Bagg J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103(5): 610-7.
166. Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. J Endod. 2006a; 32(12): 1135-1138.
167. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Culture independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic infections. J Endod. 2006b. 32 (6): 509-512.
168. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* firmA genotypes in primary endodontic infections. Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(3): 474-8.
169. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of *Dialister pneumosintes* in acute periradicular abscesses of humans by nested PCR. Anaerobe. 2002b. 8 (n): 75-78.
170. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infections. J Endod. 2009. 35(10): 1359-62.
171. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol. 2008; 46(11): 3599-606.

172. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. Lett Appl Microbiol. 2005c. 41(1): 12-16.
173. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. Anaerobe. 2002a. 8 (n): 200-208.
174. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. Int Endod J. 2003a. 36(1): 20-26.
175. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. FEMS Microbiol Lett. 2005a. 250 (2): 279-285.
176. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Occurrence of two newly named oral Treponemes – *Treponema parvum* and *Treponema putidum* – in primary endodontic infections. Oral Microbiol Immunol; 2005b; 20(6), 272-275.
177. Rocha H. Normas para a seleção de antibióticos para uso clínico. In: Silva P (organizador). Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002. p. 960-967.
178. Rosenblatt JE, Stewart PR. Anaerobic bag culture method. J Clin Microbiol. 1975, 1(6): 527-530.
179. Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Period Res. 2003. 38(5): 4465–70.
180. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. In: White BA, editor. PCR Protocols: current methods and applications. Totowa: Humana Press; 1993. Methods in Molecular Biology, v.15.

181. Sabiston CB, Gold WA. Anaerobic bacteria in oral infections. *Oral Surg.* 1974; 38(2): 187-191.
182. Sabiston CB, Grigsby WR, Segerstrom NS. Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976; 41(4): 430-435.
183. Saito D, Marsh TL, Cannavan FS, Höfling JF, Gonçalves RB. Assessment of intraradicular bacterial composition by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(5) 369-76.
184. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(2): 112-22.
185. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Diversity of spirochetes in endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(5): 1352-7.
186. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. Nov., com. Nov. *Int J Syst Bacteriol.* 2002. 52(Pt3):841-849.
187. Santos FA, Bastos EM, Rodrigues PH, Uzeda M, Carvalho MA, Farias LM. Susceptibility of *Prevotella intermedia/nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to própolis (bee glue) and other antimicrobial agents. *Anaerobe.* 2002; 8(1): 9-15.
188. Sasagawa S, Suzuki K, Sakatani T, Fujioka T. Effect of nicotine on the functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Leukoc Biol.* 1985; 37(5): 493-502.
189. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod.* 2008; 34(5): 541-5.

190. Sato FRL, Hajala FAC, Freire Filho FWV, Moreira RWF, Moraes M. Eight-year retrospective study of odontogenic origin infections in a postgraduation program on Oral and Maxillofacial Surgery. *J Oral Maxillof Surg.* 2009; 67(5): 1092-7.
191. Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, Forney LJ. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (t-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 80(3): 365-80.
192. Schuknecht B, Stergiou G, Graetz K. Masticator space abscess derived from odontogenic infection: imaging manifestation and pathways of extension depicted by CT and MR in 30 patients. *Eur Radiol.* 2008; 18(9): 1972-9.
193. Schumacher UK, Wittorf S, Werner H. Comparative assessment of the E-test for testing antibiotic susceptibilities of *Prevotella bivia* and nine other *Prevotella* species. *Anaerobe.* 1999; 5(n): 465-467.
194. Scott D, Siboo IR, Chan ECS, Siboo R. An extracellular enzyme with hyaluronidase and chondroitinase activities from some oral anaerobic spirochaetes. *Microbiol.* 1996; 142(Pt9): 2567-76.
195. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2): 95-101.
196. Sedgley CM, Molander A, Flanagan SE, Nage AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlén G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(1): 10-19.
197. Seppänen L, Lauhio A, Lindqvist C, Suuronen R, Rautemaa R. Analysis of systemic and local odontogenic infection complications requiring hospital care. *Journal of Infection.* 2008;; 57(2): 116-22.

198. Shah HN, Collins DM. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. Int J Syst Bacteriol. 1988; 38(1): 128-31.
199. Shah HN, Collins DM. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int J Syst Bacteriol. 1990; 40(2): 205-8.
200. Shah HN, Gharbia SE. Studies on the physiology and ecology of black-pigmented Gram-negative anaerobes which may be important in disease development. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993; 6(2-3): 165-172.
201. Shah PM. The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline? Clin Microbiol Infect. 2005; 11(Suppl 3): 36-42.
202. Shinn DLS. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis (letter to the editor). Lancet. 1962; 1: 1191.
203. Shovelton DS. Infection in root canals. Brit Dent J. 1960; 2: 115-118.
204. Silva P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
205. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infections. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 512-30.
206. Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent. 2003a; 31(5): 333-9.
207. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polimerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radientis* in primary and persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod. 2003b; 96(2): 215-222.

208. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infection as detected by nested PCR. J Endod. 2003c; 29(6): 390-93.
209. Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, and *T. lecithinolyticum*. Arch Oral Biol. 2003e; 48(7): 495-502.
210. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod. 2003f; 29(4): 244-247.
211. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases. Oral Microbiol Immunol. 2003g; 18(4): 263-265.
212. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polimerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radientis* in primary and persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod. 2003h; 96(2): 215-222
213. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Nested PCR detection of *Centipeda periodontii* in primary endodontic infections. J Endod. 2004b; 30(3): 135-137.
214. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Treponema* species associated with abscess of endodontic origin. Oral Microb Immunol. 2004d; 19(5): 336-339.
215. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005a; 31(6): 411-23.
216. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. J Endod. 2005b; 31(7): 488-498.

217. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005c; 43(7): 3314-3319.
218. Siqueira Jr JF, Roças IN. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006a; 102(2): 259-264.
219. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007a; 18(4): 267-280.
220. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Molecular detection and identification of *Synergistes* phylotypes in primary endodontic infections. *Oral Dis.* 2007b; 13(4): 398-401.
221. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009a; 107(6): 870-878.
222. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009b; 88(11): 969-81.
223. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009c; 88(1): 61-5.
224. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FRF, Santos KRN. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod.* 2004e; 30(9): 638-643.
225. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Andrade AFB, Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. *J Endod.* 2003d; 29(2): 111-113.
226. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SSM, Alves FRF, Rosado AS. Profiling root canal bacterial communities associated with chronic

- apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod.* 2008b; 34(12): 1457-61.
227. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J.* 2001a; 34(4): 280-284.
228. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patologias pulpar e perirradicular. In.: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica.* 2 ed. 2004a. Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan. p. 17-78.
229. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002a; 93(2): 174-8.
230. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J.* 2002b; 35(4): 345-351.
231. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-Direct polymerase chain reaction. *J Endod.* 2001b; 27(3): 164-167.
232. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2004c; 19(6): 363-370.
233. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Silva MG. Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2008a; 34(11): 1332-6.

234. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2001d; 92(4): 451-7.
235. Sklavounos A, Legakis NJ, Ioannidou H, Patrikiou A. Anaerobic bacteria in dentoalveolar abscesses. *Int J Oral Surg.* 1986; 15(3): 288-91.
236. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* 1995; 20(Supl 2): S304-7.
237. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38(n): 135-87.
238. Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe.* 2005; 11(1/2): 79-91.
239. Sousa ELR, Ferraz CCR, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(3): 332-9.
240. Sousa ELR. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais e a suscetibilidade de bactérias anaeróbias prevalentes frente a diversos antibióticos [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.
241. Souza Filho FJ, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA. Drenagem de abscessos periapicais. In: *Endodontia/Trauma.* São Paulo: Artes Médicas. 476p.
242. Spolidorio DMP, Spolidorio LC. Técnicas básicas de biologia molecular. In: Estrela C. *Metodologia científica.* 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

243. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Topics*. 2004; 9(1): 5-14.
244. Srirompotong S, Art-Smart T. Ludwig's angina: a clinical review. *Eur Arch Otorh*. 2003; 260(7): 401-3.
245. Starr SE, Thompson FS, Dowell Jr VR, Balows A. Micromethod system for identification of anaerobic bacteria. *Appl Microbiol*. 1973; 25(5): 713-17.
246. Stroe W, Huag RH, Lillich TT. The changing face of odontogenic infections. *J Oral Maxillof Surg*. 2001; 59(7): 739-48.
247. Strohl WA, Rouse W, Fisher BD. *Microbiologia Ilustrada*. ArtMed Editora: Rio de Janeiro; 2004.
248. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. 5 ed. 1993. California: Star Publishing Company. 230pp.
249. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod*. 2002; 28(4): 304-310.
250. Sundqvist G, Johansson E, Sjören U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod*. 1989; 15(1): 13-19.
251. Sundqvist G. *Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulps* [tese]. University of Umea; 1976.
252. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992; 18(9): 427-430.
253. Syed SA, Loesche WJ. Efficiency of various growth media in recovering oral bacteria flora from human dental plaque. *Appl Microbiol*. 1973; 26(4): 459-465.
254. Tally FP, Stewart PR, Sutter VL, Rosenblatt JE. Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. 1975; 1(2): 161-4.

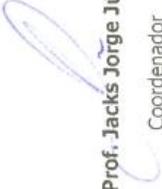
255. Tanabe S, Bodet C, Grenier D. *Peptostreptococcus micros* cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages. *J Endotoxin Res.* 2007; 13(4): 219-26.
256. Tharagonett D, Sisson PR, Roxby CM, Ingham HR, Selkon JB. The API ZYM system in the identification of Gram-negative anaerobes. *J Clin Pathol.* 1977; 30(6): 505-509.
257. Tindall BJ, Euzéby JP. Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatrionicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadricoccus* Maszenan *et al.* 2002, respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 2006. 56(Pt11):2711-13.
258. Thomas SJ, Atkinson C, Hughes C, Revington P, Ness AR. Is there an epidemic of admissions for surgical treatment of dental abscesses in the UK. *Br Med J.* 2008; 336(7655): 1219-20.
259. Tlaskalova-Hogenova H, Stpankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borowska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesova A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 2004; 15(2-3): 97-108.
260. Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology.* 1994; 78(4): 511-21.
261. Torabinejad M. Pulp and periradicular pathosis. In.: Walton RE, Torabinejad M. Principles and practice of endodontics. 3 ed. Philadelphia: Saunders. 2002. p. 27-48.
262. Tracy JW, Webster LT. Fármacos usados no tratamento das protozooses – Tripanosomíase, leishmaniose, amebíase, giardíase, tricomoníase e outras

- protozoonoses. In: Goodman Gilman A (organizador). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9. ed. Santiago: McGraw-Hill; 1996. p. 725-740.
263. van Dalen PJ, van Deutekom-Mulder EC, de Graaf J, van Steenbergen TJM. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes e *Prevotella* specides in pure and mixed culture. J Med Microbiol. 1998; 47(2): 135-40.
264. van Steenbergen TJ, van Winkelhoff AJ, Graaff J, Duerden BI. Antibiotic susceptibility of black pigmented gram-negative anaerobes. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993; 6(2-3): 229-234.
265. Van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. J Periodontol. 2001; 72(5): 666-71.
266. van Winkelhooff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontites patients in the Netherlands and Spain. J Clin Periodontol. 2005; 32(8): 893-8.
267. van Winkelhoff AJ, van Steenbergen TJM, de Graaff J. Oxygen tolerance of oral and non-oral black-pigmented *Bacteroides* species. FEMS Microbiol Lett. 1986; 33 (2): 215-8.
268. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006; 44(4): 1274-82
269. Von Konow L, Nord CE, Nordenram A. Anaerobic bacteria in dentoalveolar infections. Int J Oral Surg. 1981; 10(...): 313-22.
270. Wade WG, Spratt DA, Dymock D, Weightman AJ. Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. Clin Infect Dis. 1997; 25(Suppl 2): 235-6.

271. Walton RE. Culturing the exsudate of an odontogenic infection – a useful procedure? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1999; 88(5): 525.
272. Wang H, Ahani A, Pogrel MA. A five-year retrospective study of odontogenic maxillofacial infections in a large urban public hospital. *Int J Oral Maxillof Surg.* 2005; 34(6): 646-9.
273. Wexler HM, Molitoris E, Finegold SM. Effect of β -lactamase inhibitors on the activities of various β -lactam agents against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemoth.* 1991; 35(6): 1219-1224.
274. Williams JD. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents.* 1999; 12 (Suppl 1):S3-7.
275. Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter LA, Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven treponema species in health- and disease-associated dental plaque by Nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (3): 867-9.
276. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987; 51(2): 221-71.
277. Wong T-Y. A nationwide survey of deaths from oral and maxillofacial infections: the Taiwanese experience. *J Oral Maxillof Surg.* 1999; 57(11): 1297-9.
278. Woo PC, Fung AM, Lau SK, Yuen KY. Identification by 16S rRNA gene sequencing of *Lactobacillus salivarius* bacteremic cholecystitis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(1): 265-7.
279. Wynn RL, Bergman SA. Antibiotics and their use in the treatment of orofacial infections, part I. *Gen Dent.* 1994; 42(5): 398-402.
280. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15(4): 273–5.

281. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod.* 1987, 13(1): 24-28.
282. Zachariades N, Vairaktaris E, Mezitis M, Rallis G, Kokkinis C, Moschos M. Orbital abscess: visual loss following extraction of a tooth – case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(4): e70-3.
283. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* 1996;67:1050-4.
284. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol 2000.* 1995; 7(n): 69-82.
285. Zaura E, Keijser BJJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009; 15(9): 259.
286. Zhou ZH, Hogetsy T. Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. *New Phytol.* 2002; 154(2): 529-39.
287. Ziemuhr W, Ohlsen K, Karch H, Korhonen T, Hacker J. Evolution of bacterial pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56(9-10): 719 –28.

ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

| | |
|--|--|
|  |  |
| COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS | |
| CERTIFICADO | |
| <p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Caracterização fenotípica e molecular da microbiota de dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e susceptibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas isoladas", protocolo nº 055/2008, dos pesquisadores BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES e FRANCISCO MONTAGNER, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/06/2008.</p> | |
| <p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Phenotypic and molecular characterization of the microbiota in necrotic teeth and periapical abscesses and antimicrobial susceptibility of the anaerobic isolates", register number 055/2008, of BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES and FRANCISCO MONTAGNER, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 13/06/2008.</p> | |
|  Prof. Pablo Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP |  Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP |
| <p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p> | |

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA PESQUISA CLÍNICA

As informações contidas neste termo foram fornecidas pela orientadora Prof^ª. Dr^ª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pelo aluno de pós-graduação Francisco Montagner, com o objetivo de convidar o voluntário a participar, ter conhecimento do tratamento de urgência a ser realizado, e de que maneira poderá contribuir para o trabalho de pesquisa. Estando ciente disso, o voluntário autoriza a sua participação, tendo concordado sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Caracterização fenotípica e molecular da microbiota de dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e susceptibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas isoladas".

II. JUSTIFICATIVA

O estudo dos microrganismos presentes nos canais radiculares e que estão relacionados com a dor são realizados há mais de dez anos na Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Este estudo permite que se conheçam quais são os microrganismos presentes nestes casos e permitem estudar a sua sensibilidade aos antibióticos empregados na Odontologia.

II. OBJETIVOS

Este trabalho tem o objetivo de estudar as bactérias encontradas nos dentes que precisam de tratamento de canal quando a pessoa está com dor e edema na face. Descobrir estas bactérias iremos: Relacionar essas bactérias com a dor; Fazer testes para ver qual antibiótico é melhor contra estas bactérias. Isto poderá ajudar a entendermos a causa da dor. O estudo de bactérias que continuam no canal radicular com dor e no edema, permite a realização de um teste que orientará a escolha correta de um antibiótico, e se for necessário irá complementar o seu tratamento ajudando o organismo a combater a infecção.

III. PROCEDIMENTOS

A coleta de amostra de bactérias é simples e faz parte do tratamento de canal. Ela consiste em colocar um cone de papel absorvente dentro do canal no comprimento do dente que foi observado na radiografia. Este cone de papel é normalmente usado para secar o canal. Para o tratamento do edema, é preciso fazer uma pequena cirurgia que será realizada após a limpeza do canal. Antes dela, será removido uma pequena quantidade do pus. Depois de secar o canal e de remover o pus, o cone de papel e o pus serão colocados num meio de cultura, que permite a conservação e o crescimento das bactérias. Neste estudo não há grupos placebo ou controle. O tratamento para a dor de origem do canal e do edema é o mesmo que os voluntários receberiam se não aceitassem em participar do trabalho, não havendo nenhum método alternativo de tratamento da dor.

IV. DESCONFORTOS OU RICOS ESPERADOS

A coleta da amostra é indolor, pois a área que receberá tratamento e o dente envolvido estarão sob efeito de anestesia local. Se você sentir dor, esta não será por causa da coleta de amostra e sim pela realização da anestesia, limpeza do dente ou mesmo causados pela infecção no canal radicular e região do edema. Este desconforto poderia ocorrer independentemente de ser realizada a coleta. Após o tratamento, se a dor e o edema persistirem, você poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 h e de 13:30 às 17:30 h. Caso não seja possível ser atendido no Plantão, você poderá procurar os Pesquisadores responsáveis (Francisco Montagner e Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes). Os telefones para contato são: 19 2106-5215 (Faculdade) ou 19 8181 6312.

V. GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar.

VI. GARANTIA DE RECUSA À PARTICIPAÇÃO OU SAÍDA DO ESTUDO

Caso você não queira participar do estudo, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente. Se você se recusar a participar ou se você quiser desistir, em qualquer fase da pesquisa, não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual continuará normalmente.

VII. GARANTIA DE SIGILO

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a sua privacidade (seu nome não será revelado) quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.

VIII. GARANTIA DE RESSARCIMENTO

A pesquisa não lhe acarretará nenhum gasto previsível.

IX. GARANTIA DE INDENIZAÇÃO OU REPARAÇÃO DE DANOS

Não há riscos previsíveis associados à pesquisa, e portanto não há previsão de indenização ou reparação de danos.

Eu, _____, certifico que tenho lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou Francisco Montagner, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Deste termo de consentimento livre esclarecido, serão geradas duas vias, sendo uma direcionada ao voluntário e a demais para o pesquisador.

Piracicaba, ____ de _____ de 2008.

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP, endereçado a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, na cidade de Piracicaba/SP. Telefone/FAX: 19 2106 5349 – E-mail: cep@fop.unicamp.br – www.fop.unicamp.br/cep.

APÊNDICE II – Meio de Transporte

VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar)

1. Descrição

O meio de transporte VMGAIII (Viability Medium Göteborg Agar) foi descrito inicialmente por Moller (1966) e por Dahlén et al. (1993) e é preparado para suportar a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios sem ocorrer crescimento. É aplicado para amostras pequenas, como as coletadas por pontas de papel absorvente. Se armazenado em recipiente bem fechado e sem contato com oxigênio, pode ser guardado por longo tempo. Deve ser protegido da luz. O indicador de oxi-redução é o azul de metileno e sua função é consumir o oxigênio, mantendo o meio reduzido. A solução protetora é a peptona 0,1% e a gelatina 5%. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluido acima de 30°C.

2. Preparo do meio

2.1. Componentes necessários

- a) Acetato de fenilmercúrio (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. P5554 – 25 g;
- b) Glicerofosfato de sódio (Merck, Alemanha) Ref. 4168 – 25 g
- c) CaCl anidro ou CaCl₂.6H₂O (Ecibra, Santo Amaro – SP, Brasil), Ref. 0490 – 500 g;
- d) KCl (Synth, Diadema – SP, Brasil), Ref. C1058.01.AG – 500 g;
- e) MgSO₄.7H₂O (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. M1880 – 500 g;
- f) NaOH (Dinâmica, Brasil) Ref. CAS1310-73-2 cod. 1702-1 – 500 g
- g) Agar bacteriológico (Acumedia, EUA), Ref. 7178A – 500 g
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA), Ref. 214340 – 500 g
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA), (Sigma, St. Louis, EUA) Ref. T4532 – 100 g

- j) Thiotona ou **Peptona** (BBL, Cockeyville, EUA), (Biobrás, MG, Brasil) Ref. 177-2 – 500 g
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. C4820 - 25 g
- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. T3758 – 500 mL

Autoclavar previamente:

- a) Frascos de Eppendorf ou vidros pequenos com 3 bolinhas de vidro (Glass beads). A quantidade de Eppendorfs é de acordo com o volume que será preparado do meio. Neste caso, se for preparar 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.
- b) Proveta de 50mL
- c) 2 frascos vazios de 500mL
- d) 2 frascos vazios de 1000mL
- e) 4 funis
- f) 4 tubos de ensaio
- g) 4 espátulas
- h) 1 frasco de Becker pequeno
- i) 2 provetas de 200mL
- j) 30 pedaços de papel alumínio
- k) 1 vidro de 500mL

2.2. Preparo dos volumes líquidos

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **água bidestilada**.

| | 500 mL | 250 mL | 125 mL |
|----------|---------|----------|----------|
| 1 frasco | 275 mL | 137,5 mL | 68,75 mL |
| 1 frasco | 150 mL* | 75 mL* | 37,5 mL* |
| 1 frasco | 600 mL | 300 mL | 150 mL |
| 1 frasco | 5 mL | 2,5 mL | 1,25 mL |

*Colocar um peixinho para ajudar a dissolver a gelatina

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **solução salina**.

| | | | |
|----------|--------|--------|---------|
| | 500 mL | 250 mL | 125 mL |
| 1 frasco | 50 mL | 25 mL | 12,5 mL |

2.3. Solução de Sais de Estoque IV

Verificar se tem a **solução de sais de estoque IV** (Cor azul) e autoclavar, caso não tenha, autoclavar:

| | |
|----------|-------------------------------|
| 1 frasco | 60 mL de água bidestilada (1) |
| 1 frasco | 40 mL de água bidestilada (2) |
| 1 frasco | 60 mL de água bidestilada (3) |
| 1 frasco | 40 L de água bidestilada (4) |

Verificar se tem a **solução de NaOH e KOH (8M)**, caso não tenha, preparar. Volume final de 200 mL. Modo de preparo: Pesar 64g de NaOH e 89,76g de KOH. Dissolver em 140 mL de água bidestilada. Depois de dissolvido, acrescentar água bidestilada q.s.p 200 mL. Autoclavar por 20 minutos

No dia anterior, preparar as soluções:

- SOLUÇÃO 1 – Água bidestilada estéril 60mL + Acetato de fenilmercúrio 0,1g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar overnight a 56°C.
- SOLUÇÃO 2 – Água bidestilada estéril 40mL + Glicerofosfato de sódio 20g. Dissolver aquecendo levemente na manta e deixar overnight.

No dia do preparo do VMGA III, para preparar a solução azul:

- SOLUÇÃO 3 – Água bidestilada estéril 60mL + CaCl anidro 0,24g ou CaCl₂.6H₂O 0,32g + KCl 0,84g + MgSO₄.7H₂O 0,2g.

Misturar bem as SOLUÇÕES 1, 2 e 3 e resfriar em uma proveta graduada. Adicionar 40mL de água bidestilada já estéril para completar 200 mL. Ao final, adicionar 0,006g de azul de metileno e acondicionar na geladeira.

2.4. Mistura das soluções e preparo do VMGA III

a) Solução A:

| SOLUÇÃO A | 1000 mL | 250 mL | 125 mL |
|-------------------|---------|----------|----------|
| Água bidestilada | 550 mL | 137,5 mL | 68,75 mL |
| Triptose | 0,5 g | 0,125 g | 0,0625 g |
| Thitona e Peptona | 0,5 g | 0,125 g | 0,0625 g |

O frasco com água bidestilada deve estar estéril no dia anterior. Dissolver com agitação e aquecimento na manta ou no microondas por 10 segundos.

b) Solução B:

| SOLUÇÃO B | 1000 mL | 250 mL | 125 mL |
|------------------|---------|--------|---------|
| Água bidestilada | 300 mL | 75 mL | 37,5 mL |
| Gelatina | 50 g | 12,5 g | 6,25 g |

A água bidestilada deve estar pré-aquecida. O frasco com água destilada e o peixinho já devem estar estéreis no dia anterior. Aquecer no microondas por 10 segundos + 10 segundos + 10 segundos (total de 30 segundos), observando atentamente se derrete a gelatina. Deixar em banho-maria caso não derreta tudo. **Essa solução não pode mais ser autoclavada.**

c) Solução C:

| SOLUÇÃO C | 1000 mL | 250 mL | 125 mL |
|------------------|---------|---------|---------|
| Água bidestilada | 50 mL | 12,5 mL | 6,25 mL |
| Agar | 2 g | 0,5 g | 0,25 g |

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, manter em banho-maria.

d) Solução D:

| SOLUÇÃO D | 1000 mL | 250 mL | 125 mL |
|------------------|---------|---------|----------|
| Água bidestilada | 10 mL | 2,5 mL | 1,25 mL |
| L-cisteína | 0,05 g | 0,125 g | 0,0625 g |

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, manter em banho-maria.

e) Solução E:

| SOLUÇÃO E | 1000 mL | 250 mL | 125 mL |
|--------------------|---------|----------|-----------|
| Solução salina | 100 mL | 25 mL | 12,5 mL |
| Ácido Tioglicólico | 0,5 mL | 0,125 mL | 0,0625 mL |

A solução salina deve estar estéril no dia anterior. O ácido tioglicólico encontra-se no freezer, e deve ser manipulado com muito cuidado, empregando luvas e máscara.

Misturar as **SOLUÇÕES A + B + C** em frasco de 500 mL na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar 25mL da solução de sais de estoque azul IV. Adicionar a solução de ácido tioglicólico (**SOLUÇÃO E**). Ferver a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de N₂. Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar a solução de cisteína (**SOLUÇÃO D**).

Ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de NaOH + KOH, adicionando de 10 em 10 microlitros. Adicionar aos poucos, pois não tem volta. A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

Colocar 1 mL da solução em cada eppendorf e deixar levemente aberto na cabine de anaerobiose. Passar parafilme para evitar qualquer tipo de contato com oxigênio e contaminação. Proteger da luz com papel alumínio.

APÊNDICE III – Meios de Cultura

1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M, Bury, UK. Ref. Lab 90 – 500 g

1.1 Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes detoxificantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento negro.

Agentes específicos de estimulação de crescimento:

- a) Cisteína – para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, e *Bacteróides fragilis*;
- b) Arginina – para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*.
- c) Piruvato – contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia.
- d) Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e alcoóis que podem inibir o crescimento bacteriano.

O pH médio do meio de cultura é 7,4 ±0,2.

1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C. Então adicionar asepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas Placas de Petri.

1.3. Armazenagem do meio preparado

O meio preparado deve ser armazenado em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

1.4. Incubação

- a) Temperatura: 37°C;
- b) Condições Gasosas: anaerobiose (80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂);
- c) Período de tempo: 48 horas e 7dias.

1.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|-------------------------|--------------------|
| Mistura de peptonas | 23,0 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |
| Amido solúvel | 1,0 |
| Ágar nº 2 | 12,0 |
| Glicose | 0,4 |
| Piruvato de sódio | 1,0 |
| L-cisteína monoidratada | 1,0 |
| Hemina | 0,5 |
| Vitamina K | 0,001 |

| | |
|---------------------|------|
| L-arginina | 1,0 |
| Pirofosfato solúvel | 0,25 |
| Succinato de sódio | 0,5 |

1.6. Enriquecimento do Meio

1.6.1 Solução Vitamina K1 (1 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA. (Menadione, 25 g Ref. M5625)

Pesar 0,1g de Vitamina K1 e adicionar a um tubo contendo 100mL de etanol absoluto. Armazenar o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

1.6.2 Solução de Hemina (5 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA. Ref. H5523 – 25 g

Dissolver 0,5g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio 1N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121°C por 15 min. Para usar como suplemento, adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

2. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) – LAB M (Bury, UK) Ref. Lab 71 – 500 g

2.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o potencial de óxido-redução do meio e o agar inibe a absorção do oxigênio. O pH do meio é $7,4 \pm 0,2$.

2.2. Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização, que é feita em autoclave a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.

2.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, por até 3 meses, a $15-20^{\circ}\text{C}$, fora do alcance da luz.

2.4. Incubação

Incubar a 37°C por 24-72 horas, mantendo os tubos bem fechados.

2.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|----------------------|--------------------|
| Mistura de peptonas | 15 |
| Cloreto de sódio | 2,5 |
| Extrato de levedura | 1,0 |
| Ágar nº 1 | 0,75 |
| L-cisteína | 0,5 |
| Hemina | 0,005 |
| Vitamina K | 0,005 |
| Resazurina | 0,001 |
| Bicarbonato de sódio | 0,4 |

3. Brain Heart Infusion Ágar (BHI) – LAB M (Bury, UK), (Himedia, Mumbai, India) Ref. M211 – 500 g

3.1 Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição. . O pH do meio é $7,4\pm 0,2$.

3.2 Preparo

Adicionar 24,5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje, adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de Petri.

3.3. Armazenagem

Armazenar as placas por período de até 7 dias em temperatura de 4°C , preferencialmente no escuro.

3.4 Incubação

Tempo e temperatura são determinados para cada microrganismo.

3.5 Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| Infusão de sólidos de cérebro e coração | 17,5 |
| Proteose peptona | 10 |
| Glicose | 2 |
| Cloreto de sódio | 5 |
| Fosfato di-sódico | 2,5 |
| Agar número 2 | 12 |

4. Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK), (Himedia, Mumbai, India) Ref. M211 – 500 g

4.1. Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e petonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido. O pH do meio é $7,4\pm 0,2$.

4.2. Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos, sendo a seguir dissolvida sob aquecimento brando, antes de ser dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização. A esterilização é feita em autoclave a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.

4.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, até 3 meses a $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$ protegidos da luz.

4.4. Incubação

Incubar aerobicamente a 37°C por até 15 dias.

4.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------|--------------------|
| Infusão de sólidos de cérebro de boi | 12,5 |
| Infusão de sólidos de coração | 5,0 |
| Proteose peptona | 10,0 |
| Glicose | 2,0 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |
| Fosfato di-sódico | 2,5 |

5. Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-UK), (Himedia, Mumbai, India) Ref. M074
– 500 g

5.1 Descrição

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação do crescimento microbiano. A glicose fornece fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e de alcoóis que poderiam inibir o crescimento microbiano. O agar inibe a absorção do oxigênio e corrente de propagação. O pH médio do meio é de $7,5 \pm 0,2$.

5.2. Preparo

Misturar 22,5g do pó a 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C . Adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 500 μL de Hemina e menadiona preparados previamente. Homogeneizar e distribuir em placas de Petri estéreis.

5.3 Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C , fora do alcance da luz.

5.4. Incubação

Incubar a 37°C anaerobicamente em atmosfera de 80% H_2 , 10% N_2 , 10% CO_2 , por períodos entre 48 horas e 7 dias.

5.6 Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|------------------|--------------------|
| Peptona | 10 |
| Extrato de carne | 5,0 |
| Glicose | 10,0 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |
| Agar | 15 |

6. Agar Mitis Salivarius (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos), Ref. 229810
– 500 g

6.1 Descrição

Meio de cultura empregado para o isolamento de *Streptococcus mitis*, *S. salivarius*, e *Enterococcus*.

6.2. Preparo

Misturar 90g do pó a 1000 mL de água deionizada. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

6.3. Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

6.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

6.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|---------------------------------|--------------------|
| Digerido pancreático de caseína | 6,0 |
| Peptona de proteosa número 3 | 5,0 |
| Dextrose | 1,0 |
| Sacarose | 50,0 |
| Fosfato dipotássico | 4,0 |
| Azul trípano | 0,075g |
| Violeta cristal | 0,0008 |
| Agar | 15g |

7. Agar MacConkey (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos), Ref. 212123 – 500 g

7.1 Descrição

Meio de cultura para isolamento e diferenciação de organismos entéricos.

7.2. Preparo

Misturar 50g do pó a 1000 mL de água deionizada. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

7.3 Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

7.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

7.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|------------------------|--------------------|
| Peptona | 17 |
| Proteose peptona | 3,0 |
| Lactose | 10,0 |
| Sais biliares número 3 | 1,5 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |
| Agar | 13,5 |
| Vermelho neutro | 0,03 |
| Cristal violeta | 0,001 |

8. Agar m Enterococcus (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos), Ref. 274620 – 500 g

8.1. Descrição

Meio de cultura empregado para o isolamento e contagem de *Enterococcus* em água e outros materiais através de filtração em membrana ou dispersão em placa.

8.2. Preparo

Misturar 42g do pó a 1000 mL de água estéril. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

8.3. Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

8.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

8.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|--------------------------------|--------------------|
| Triptose | 20,0 |
| Extrato de fungo | 5,0 |
| Dextrose | 2,0 |
| Fosfato dipotássico | 4,0 |
| Azido de sódio | 0,4 |
| Agar | 10 |
| Cloreto de trifenil tetrazólio | 0,1 |

9. Agar Sabouraud Dextrose (Himedia, Mumbai, India, Ref. M063 – 500g)

9.1. Descrição

Meio de cultura empregado para o cultivo de fungos e microrganismos acidófilos.

9.2. Preparo

Misturar 65g do pó a 1000 mL de água estéril. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

9.3. Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

9.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

9.5. Fórmula

| Componentes | Concentração (g/L) |
|----------------------------------|--------------------|
| Caseína digerida enzimaticamente | 10,0 |
| Dextrose | 40,0 |
| Agar | 15 |

APÊNDICE IV – Coloração de Gram

1. Princípios

É utilizada para o exame microscópio direto das amostras, para a caracterização das bactérias quanto a sua morfologia e quanto as características de sua parede celular.

Emprega como corantes o cristal violeta, o iodo de Gram, o descorante (álcool-acetona) e o contracorante (safranina ou fucsina). O cristal violeta (violeta de genciana) serve como coloração primária, unindo-se à parede celular bacteriana após o tratamento com uma solução de iodo fraca, que serve como mordente para a ligação do corante. Algumas espécies bacterianas, devido à natureza química da parede celular, têm a capacidade de reter o cristal violeta, mesmo depois do tratamento com um descorante orgânico, como a mistura de partes iguais de álcool etílico a 95% e acetona. As bactérias que retêm o corante aparecem negro-azuladas quando observadas ao microscópio e são denominadas gram-positivas. Certas bactérias perdem a coloração primária com cristal violeta quando são tratadas com o descorante, talvez devido ao alto conteúdo lipídico da parede celular, sendo denominadas Gram-negativas. Assim, com a aplicação do contracorante, apresentam-se avermelhadas quando visualizadas no microscópio.

2. Componentes

a) Cristal Violeta

| Componente | Quantidade |
|----------------------------|------------|
| Cristal violeta | 2 g |
| Álcool etílico a 95% | 20 mL |
| Oxalato de NH ₄ | 0,8g |

| | |
|----------------|--------|
| Água destilada | 100 mL |
|----------------|--------|

b) Iodo de Gram

| Componente | Quantidade |
|--------------------|------------|
| Iodeto de potássio | 2 g |
| Cristais de iodo | 1g |
| Água destilada | 100 mL |

c) Descorante

| Componente | Quantidade |
|----------------------|------------|
| Acetona | 50 mL |
| Álcool etílico a 95% | 50 mL |

d) Contracoloração

| Componente | Quantidade |
|----------------------|------------|
| Safranina | 2,5 g |
| Álcool etílico a 95% | 100 mL |
| Água destilada | 100 mL |

3. Procedimentos

- Fazer sobre uma lâmina um esfregaço delgado do material em estudo e deixar secar no ar.
- Fixar o material na lâmina, utilizando-se o calor da chama no Bico de Bunsen.
- Colocar a lâmina em um suporte para coloração.

- d) Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, por 1 minuto. Lavar em água corrente.
- e) Cobrir o esfregaço com a solução de iodo de Gram, por um minuto. Lavar em água corrente.
- f) Aplicar o descorante por 15 segundos sobre a lâmina.
- g) Imediatamente, cobrir a lâmina com contracorante, por 30 segundos a 1 minuto.
- h) Deixar secar no ar, colocando a lâmina em posição vertical.
- i) Examinar em microscópio óptico, com óleo de imersão, com aumento de x100.

APÊNDICE V – Teste da Catalase

1. Procedimentos

Empregar colônias novas, com 24 a 72 horas de crescimento, preferencialmente de meios que não contenham agar. Com uma alça, colher uma porção da colônia e dispensar sobre uma lâmina de vidro estéril. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio 15% (Dinâmica, Ref. 7722-84-1, 1000 mL)

2. Interpretação dos resultados

- a) Reação positiva: formação de bolhas imediata
- b) Reação negativa: ausência de formação de bolhas. Formação de bolhas após 20 a 30 segundos ocorrem pois algumas bactérias apresentam outras enzimas capazes de degradar peróxido de hidrogênio.

APÊNDICE VI – Teste da Oxidase – Bactident Oxidase (Merck, Darmstadt, Alemanha, Ref. 1.133000001, 50 strips)

1. Princípios

Os citocromos são proteínas que atuam como último elemento de ligação na cadeia respiratória aeróbia, transferindo hidrogênios ao oxigênio, com formação de água. O sistema citocromo é encontrado em microrganismos aeróbios, ou anaeróbios facultativos. Assim, a prova da oxidase é importante para identificação de microrganismos que carecem da enzima e são anaeróbios obrigatórios. A prova é importante na identificação de espécies pertencentes à Enterobacteriaceae (todas negativas) de bactérias como Pseudomonas, Aeromonas, Neisseria, Campylobacter e Pasteurella (todas positivas).

A prova da citocromo-oxidase utiliza corantes que substituem o oxigênio como acceptor artificial de elétrons. No estado reduzido, o corante é incolor; entretanto, em presença de citocromo oxidase e de oxigênio atmosférico, a p-fenilenodiamina é oxidada e forma azul-de-indofenol.

2. Procedimentos

- a) Realizar uma diluição da colônia em água bidestilada
- b) Aplicar o a fita impregnada com o corante
- c) Aguardar de 15 a 20 segundos.

3. Resultados (após 15 a 20 segundos)

- a) Positivo – coloração roxa ou preta.
- b) Negativo – coloração amarela.

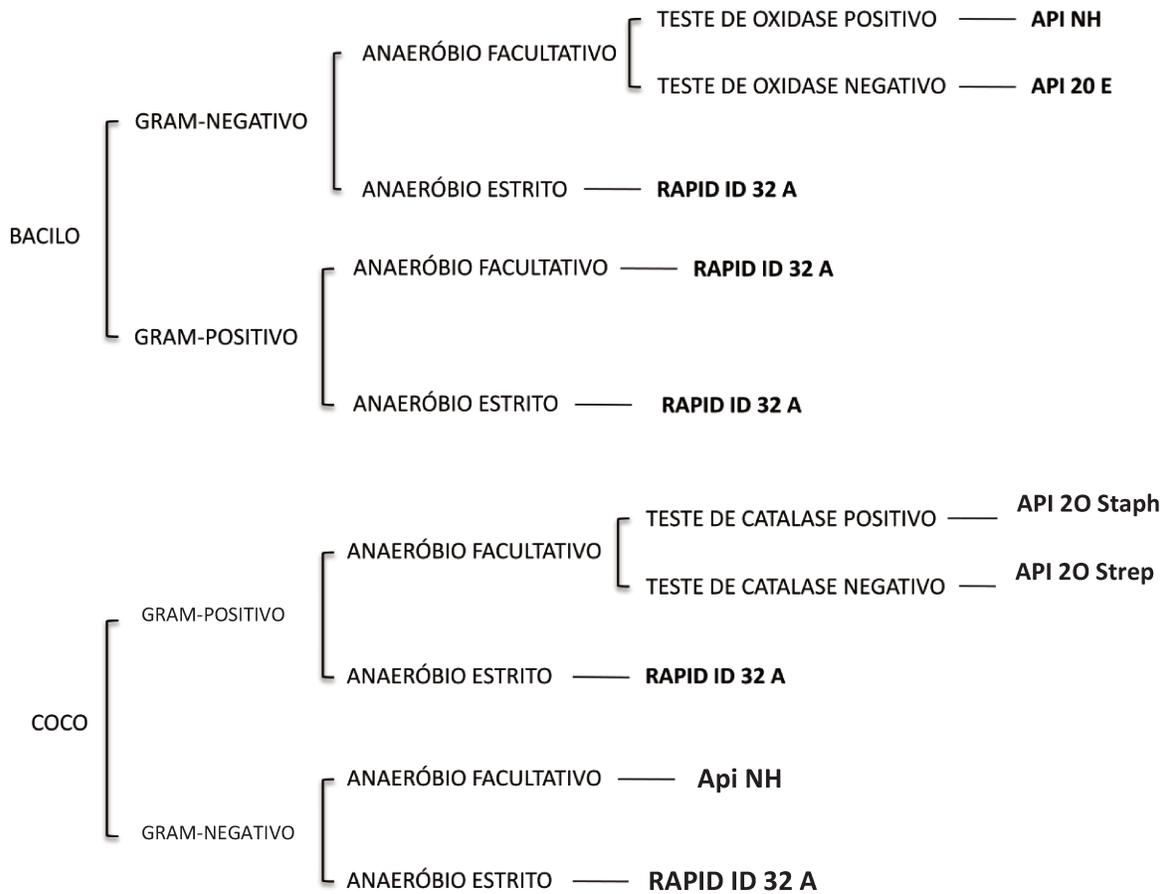
APÊNDICE VII – Teste da Fluorescência

Summanen et al (1993) descreve os procedimentos para execução do teste complementar de fluorescência. O emprego de meio de cultura contendo sangue de carneiro ou coelho intensifica a detecção de fluorescência de *Porphyromonas* e *Prevotellas* pigmentadas.

1. Procedimentos

- a) As placas de cultura devem ter sido incubadas pelo menos por 7 dias.
- b) Expor uma placa de cultura bem próxima à luz ultra-violeta.
- c) Aguardar algum tempo.
- d) Observar se as colônias oferecem coloração vermelha
- e) Se o resultado for negativo, adicionar Adicione 0,1mL de metanol 100% a um tubo de Eppendorf, emulsionando uma colônia ou várias colônias de um mesmo microrganismo no metanol. Observe na câmara escura sob luz UW-UV. Se não houver mudança de cor está confirmado o resultado negativo, se desenvolver uma fluorescência vermelha é demonstrado um resultado positivo. Colônias pigmentadas de negro que fluorescem sob a luz UV podem ser supostamente identificadas como pertencentes ao grupo das *P. intermedia/nigrescens* ou *P. melaninogenica*.

APÊNDICE VIII - Fluxograma para seleção do kit de identificação microbiana, baseando-se em morfologia da célula, coloração de Gram, requerimento gasoso, teste de catalase e teste de oxidase.



APÊNDICE IX – Kits para Identificação Microbiana

1. API 20 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

1.1. Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos *Streptococcus* encontrados na microbiologia médica.

A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes.

Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH.

As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo “Api 20 Strep Analytical Profile Index”, ou via site do fabricante na internet.

1.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37°C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos

permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4. Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de “API GP Medium” e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP.

Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”, ou no site do fabricante.

2. Rapid ID 32 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

2.1 Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para estreptococos e microrganismos relacionados utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas que são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados.

Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou o site do fabricante na internet.

2.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas Ágar sangue. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamente por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP A e VP B no teste do VP (cúpula 0.0); FB nos testes APPA a GTA (cúpulas 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5); e NIN no teste de HIP (cúpula 0.6). Todas as reações são lidas após 5 minutos baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 StrepAnalytical Profile Index” ou a leitura é feita site do fabricante na internet.

3. API Staph - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France

3.1. Descrição

Api Staph (#20500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio “Api Staph Medium” que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de “Api Staph Medium”, folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index” ou no site do fabricante na internet.

3.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Api Staph Medium” para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Staph com o inóculo bacteriano preparado no “Api Staph Medium”, evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contendo os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C por 18-24 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido b-naftil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index”.

4. Rapid ID 32 A - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France

4.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou o site do fabricante na internet.

4.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Ágar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37°C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inoculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C em anaerobiose por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou no site do fabricante.

5. Api 20 C AUX

5.1 Descrição

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica.

O API 20 C AUX consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e identificação é obtida pelo catálogo *Analytical Profile Index* ou usando um programa computadorizado de identificação.

5.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de Agar Sabouraud 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria em 2 mL meio para suspensão "Suspension Medium" ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 µ L no tubo "C Medium". Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas.

Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula "0" da galeria) para ser interpretada a leitura de toda galeria. Através do catálogo "Analytical Profile Index" os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

6. **RapID NH system** - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

6.1. **Descrição**

O sistema RapID NH é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, e também *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencionais e cromogênico.

Cada Kit consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para resultados e um manual de instruções.

Após 4 horas de incubação as reações são obtidas através da leitura visual.

Identificações são realizadas usando cada escore de teste individual, em conjunto com as informações obtidas através da morfologia colonial, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. O resultado padrão do escore positivo e negativo é usado como base para identificação do teste isolado pela comparação dos resultados obtidos com resultado padrão que é encontrado no manual de dados (*RapID NH System Code Compendium*).

O recipiente de teste RapID NH e reagentes devem ser estocados a 2-10°C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30°C, na embalagem original.

6.2. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37°C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor. O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

APÊNDICE X – Extração do DNA microbiano

Os procedimentos de extração foram realizados utilizando-se o conjunto QIAmp mini Kit. (QYAGEN, Valencia, Califórnia, EUA, Ref. 51306 – 250 reações)

1. Remover 300µL da amostra e adicionar a um eppendorf de 1,5mL.
2. Adicionar 180 µL de ATL e 20 µL de Proteinase K.
3. Agitar e incubar a 56°C por 2 horas.
4. Adicionar 200 µL de AL.
5. Agitar e incubar a 70°C por 10 min em banho seco.
6. Adicionar 200 µL de etanol puro.
7. Agitar e transferir para os tubos com filtros/colunas.
8. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
9. Transferir o filtro para o outro tubo vazio do kit.
10. Adicionar 500 µL de AW1.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
12. Transferir a coluna para outro tubo.
13. Adicionar 500 µL do AW2.
14. Centrifugar a 13000 rpm por 3 min.
15. Transferir o filtro para um eppendorf normal de 1,5mL com tampa.
16. Adicionar 100 µL de AE e aguardar 3 minutos.
17. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
18. Armazenar o DNA extraído a -20°C.

APÊNDICE XI – Métodos para realização das Técnicas Moleculares de PCR Simples e Nested-PCR.

PREPARO DOS PRIMERS

Quando receber os *primers*, fazer a reidratação dos primers e preparar uma solução de trabalho.

1. Centrifugar o tubo com o primer liofilizado por 1 minuto, 10.000 rpm a 4°C.
2. Adicionar 1mL de água Milli-Q ou Tampão TE e verificar na bula do primer a molaridade do primer em **nmoles**. No final, você terá uma solução com primer na concentração em **μM**.
3. Esperar o primer hidratar por 2 minutos.
4. Homogeneizar no vórtex por 15 segundos.
5. Preparar solução de trabalho na concentração desejada.

IMPORTANTE

| M | m M | μ M | n M | p M | f M |
|-----|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 1 M | 10^{-3} M | 10^{-6} M | 10^{-9} M | 10^{-12} M | 10^{-16} M |

A MOLARIDADE expressa a concentração de uma solução em Molar.

1 Molar = 1 mol de soluto em 1L de solução.

Por sua vez,

1 mol de soluto = massa molecular em gramas do soluto.

E, a

Massa molecular do soluto = soma das massas atômicas que compõe o soluto.

Por isso, quando misturamos o primer (pó) que está na concentração em nmol com 1mL de água, vamos obter a concentração da mistura em μM .

$$1 \text{ n mol} / 1 \text{ mL} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 1 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M} = 1 \mu\text{M}$$

PREPARO DAS dNTPs (100mM dNTPSet , **Invitrogen, São Paulo, São Paulo, cod**
10297-018)

Solução Original

Na caixa há quatro tubos com 250 μL de cada dNTP.

Preparo da SOLUÇÃO MÃE a partir da Solução original

Segundo o fabricante, se pipetarmos volumes iguais de cada uma das dNTPs e misturarmos em um Eppendorf, obteremos uma Solução Mãe com uma molaridade de 25mM.

Então, vamos preparar uma solução mãe com V_{FINAL} de 20 μL e molaridade final de 25mM.

5 μ L de ANTP + 5 μ L de GNTP + 5 μ L de CNTP e 5 μ L de TNTP

Solução Mãe com $V_{\text{FINAL}} = 20 \mu\text{L}$ e $M_{\text{FINAL}} = 25 \text{ mM}$.

Preparo da SOLUÇÃO DE TRABALHO a partir da Solução Mãe

Esta solução terá um volume final de 100 μL com uma molaridade final de 2,5 mM.

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$M_{\text{mãe}} = 25 \text{ mM}, V_{\text{mãe}} = ?$$

$$M_{\text{trabalho}} = 2,5 \text{ mM}, V_{\text{trabalho}} = 100 \mu\text{L}$$

Preciso saber o quanto em volume em tenho que pegar da SOLUÇÃO MÃE e misturar em água milli-Q para obter uma SOLUÇÃO DE TRABALHO a 2,5 mM e num volume de 100 μL .

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$25 \text{ mM} \times V_{\text{mãe}} = 2,5 \text{ mM} \times 100 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{mãe}} = 10 \mu\text{L}$$

Pegar $V_{\text{mae}} + V_{\text{agua milliQ}}$ suficiente para completar 100 μL .

10 μ L V_{mae} + 90 μ L água milli-Q.

100 μ L de SOLUÇÃO DE TRABALHO a 2,5mM.

PREPARO DA MISTURA PARA A REAÇÃO DE PCR

Em nosso trabalho avaliamos 21 cepas de *E. faecalis*, portanto o nosso número de amostras é n = 21.

A solução para a reação de PCR tem vários componentes:

- PRIMER 1
- PRIMER 2
- 10x PCR Buffer
- MgCl₂
- Taq DNA Polymerase
- dNTPs

Essa solução e o DNA extraído irá para o termociclador.

O volume total dessa solução é dado no artigo de referência. No artigo também temos referências das concentrações e/ou volumes de cada um dos componentes. Então, muitas vezes os reagentes que o artigo sugerem e os que possuímos no laboratório têm concentrações diferentes. Assim temos que proceder o ajuste de nossos compostos, principalmente através da variação de volume de cada reagente empregado, para obtermos uma solução para a reação de PCR semelhante à sugerida pelo artigo. Comparando:

Para 30 μ L (volume de uma amostar) o autor usou:

- 6pmol de PRIMER A
- 6pmol de PRIMER B

- 100 μ M de dNTPs
- 2U TaqDNA Polymerase
- 3 μ L 10x PCR Buffer

Para os PRIMERS A e B, o autor usou:

6pmol em 30 μ L, ou seja:

$$6\text{pmol} / 30\mu\text{L} = 0,2 \text{ pmol}/\mu\text{L}$$

Na equação, 1 pmol/1 μ L = 1 μ M.

Então temos que a molaridade dos primers usada é 0,2 μ M.

A concentração dos nossos primers é 5 μ M.

Quanto vamos pegar do nosso primer, em μ L, para mantermos a concentração sugerida pelo artigo?

$$M_{\text{PRIMER}} \times V_{\text{PRIMER}} = M_{\text{ARTIGO}} \times V_{\text{ARTIGO}}$$

$$5 \mu\text{M} \times V_{\text{PRIMER}} = 0,2 \mu\text{M} \times 30 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{PRIMER}} = 1,2 \mu\text{L}$$

Vamos ter que pegar 1,2 μ L de cada cada um de nossos primers.

Para as dNTPs

O autor usou 100 μ M dNTPs em 30 μ L.

Nós temos uma Solução de Trabalho de dNTPs a 2,5mM.

$$M_{\text{DNTP}} \times V_{\text{DNTP}} = M_{\text{ARTIGO}} \times V_{\text{ARTIGO}}$$

$$2,5 \text{ mM} \times V_{\text{PDNTP}} = 0,1 \text{ mM} \times 30 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{PRIMER}} = 1,2 \mu\text{L}$$

Vamos ter que pegar um volume de 1,2 μ L de nossa solução de trabalho e acrescentar aos 30 μ L da Solução para PCR para termos a mesma concentração do artigo.

Para a TaqDNA Polymerase

Se tiver 2U no artigo, colocar 2 μ L de Taq.

Se tiver 5U no artigo, colocar 5 μ L de Taq.

O CLORETO DE MÁGNÉSIO é opcional, mas ele favorece a reação. Das concentrações testadas, a que funcionou melhor foi 2 μ L. Nunca usar mais cloreto de magnésio que solução de 10x PCR Buffer.

O VOLUME DE ÁGUA MILLI-Q a ser adicionado é o que falta para completar os 30 μ L sugeridos pelo artigo. Então, soma-se os volumes de todas as outras soluções e coloca a quantidade que falta para 30 μ L.

PREPARO DA MISTURA PARA A SOLUÇÃO DE PCR

| COMPONENTES | 30 μ L | MOLARIDADE | MASTER MIX (x23) |
|-------------------|--------------|-------------|------------------|
| PRIMER A | 1,2 μ L | 0,2 μ M | 27,6 μ L |
| PRIMER B | 1,2 μ L | 0,2 μ M | 27,6 μ L |
| 10x PCR Buffer | 3 μ L | | 69 μ L |
| MgCl ₂ | 2 μ L | 2mM | 46 μ L |
| Taq | 1 μ L | | 23 μ L |
| dNTPs | 1,2 μ L | | 27,6 μ L |
| H ₂ O | 19,4 μ L | | 446,2 μ L |
| DNA amostra | 1 μ L | → | 1 μ L |

O MASTER MIX é uma solução geral que se faz para ser utilizada em todas as amostras. O número de amostras é 21, mas fazemos 2 volumes a mais para se ter um back-up.

Em um Eppendorf de 200 μ L, adicionar 29 μ L de Máster Mix + 1 μ L da solução que contém o DNA bacteriano extraído.

Colocar as amostras no termociclador.

PREPARO DA AGAROSE

Para preparar o gel de agarose devemos saber o volume do suporte para gel da cuba de eletroforese que iremos usar.

Misturar os seguintes componentes, para obter TBE 1x:

100mL de TBE 10x + 900mL de água destilada

Armazenar em um frasco para meio de cultura.

Esta solução será empregada para preparo da agarose e para preencher a cuba de eletroforese.

PREPARO DO GEL DE AGAROSE CONCENTRAÇÃO 1%

Gel de agarose (Ultra Pure TM Agarose – Invitrogen #16500-100) 100 g

Fechar bem a bandeja com os vedantes.

Bandeja Pequena (30mL)

- 30mL de TBE 1%
- 0,30g de agarose.

Bandeja Grande (100mL)

- 100mL de TBE 1%
- 1g de agarose.

1. Colocar no microondas por 1 minuto. Ver se ficou transparente. Caso necessário colocar mais alguns segundos.
2. Esperar esfriar um pouco.
3. Colocar o brometo de etídio (CUIDADO MUITO TÓXICO)
4. Verter na bandeja.
5. Colocar o pente e esperar esfriar.

BROMETO DE ETÍDIO

CUIDADO É MUITO TÓXICO!!!

Preparar uma SOLUÇÃO DE TRABALHO de Brometo de Etídio a uma concentração de 0,5µg/mL.

Para um gel de 100mL, colocamos 50µL.

CUBA DE ELETROFORESE

1. A cuba está com TBE 1x.
2. Verificar a direção de corrida (NEGATIVO PARA POSITIVO)
3. Colocar o gel na cuba com os casulos voltados para o lado NEGATIVO.
4. Verificar se ele está coberto pela solução de TBE 1x.

PREENCHIMENTO DOS CASULOS COM A REAÇÃO DE PCR

1. SELEÇÃO DO MARCADOR

A seleção do marcador depende do tamanho da banda que você vai ter.

Marcador: 100bp DNA Ladder (Invitrogen cat nº 15628-019) 50 μg

Misturar 3uL do Ladder com 2uL do x6 Loading Dye Solution em uma lâmina de vidro. Colocar esta mistura no primeiro casulo e no casulo intermediário para que possam servir como controle.

2. COLOCAÇÃO DAS AMOSTRAS NA AGAROSE

Misturar em uma lâmina de vidro 1uL de Loading Dye Solution e 5uL da reação de PCR

3. FONTE DE ELETROFORESE

Programar a corrida para: 80 V e 120mA, por 1 hora a 1,5 hora.

APÊNDICE XII – Dados demográficos, características clínicas e radiográficas do elemento dental e dos abscesso periapical presente nos pacientes que participaram do estudo.

| IDADE | GÊNERO | DENTE | DOR | | | COROA | PERIOD. | EDEMA | | | CANAL | MOBIL. | ODOR | PERIÁPICE | |
|-------|--------|-------|------|----------|----------|-------|---------|-----------|--------|--------|--------|---------|------|-----------|---------|
| | | | TIPO | TEMPO | PRÉVIA | | | TIPO | TEMPO | EXSUD. | | | | | |
| 1 | 30 | F | 31 | Localiz. | + 6 dias | Sim | Hígido | Gengivite | Local | 2 | Sangue | Seco | Não | Sim | Lesão |
| 2 | 19 | M | 11 | Difusa | 0-2 dias | Não | Cárie | Gengivite | Difuso | 1 | Sangue | Seco | Sim | Sim | Espess. |
| 3 | 20 | F | 26 | Difusa | 0-2 dias | Não | Cárie | Gengivite | Difuso | 2 | Pus | Molhado | Não | Não | Espess. |
| 4 | 26 | F | 11 | Localiz. | 0-2 dias | Não | Rest. | Saudável | Difuso | 2 | Pus | Molhado | Sim | Sim | Lesão |
| 5 | 23 | F | 11 | Localiz. | 0-2 dias | Não | Hígido | Saudável | Difuso | 3 | Sangue | Seco | Sim | Não | Lesão |
| 6 | 31 | F | 12 | Localiz. | 3-5 dias | Não | Rest. | Saudável | Local | 3 | Pus | Molhado | Sim | Sim | Lesão |
| 7 | 23 | M | 16 | Localiz. | 0-2 dias | Sim | Rest. | Gengivite | Difuso | 1 | Sangue | Seco | Não | Sim | Lesão |
| 8 | 42 | M | 12 | Localiz. | + 6 dias | Sim | Rest. | Saudável | Local | 3 | Pus | Molhado | Sim | Sim | Lesão |
| 9 | 42 | F | 37 | Localiz. | 0-2 dias | Não | Cárie | Gengivite | Local | 2 | Sangue | Molhado | Sim | Sim | Lesão |
| 10 | 39 | F | 22 | Localiz. | 0-2 dias | Não | Rest. | Saudável | Local | 1 | Sangue | Seco | Sim | Sim | Lesão |
| 11 | 21 | F | 36 | Localiz. | 3-5 dias | Sim | Rest. | Saudável | Local | 2 | Pus | Molhado | Sim | Não | Lesão |
| 12 | 44 | F | 26 | Localiz. | 3-5 dias | Não | Rest. | Saudável | Local | 2 | Pus | Seco | Sim | Sim | Lesão |
| 13 | 45 | F | 24 | Difusa | 3-5 dias | Sim | Cárie | Saudável | Local | 3 | Pus | Molhado | Sim | Sim | Espess. |
| 14 | 54 | F | 13 | Difusa | 0-2 dias | Sim | Rest. | Gengivite | Local | 1 | Pus | Molhado | Sim | Sim | Lesão |
| 15 | 26 | F | 46 | Difusa | 3-5 dias | Não | Cárie | Gengivite | Local | 1 | Pus | Molhado | Sim | Não | Lesão |
| 16 | 32 | F | 25 | Localiz. | 3-5 dias | Não | Cárie | Saudável | Local | 1 | Pus | Molhado | Não | Não | Espess. |
| 17 | 30 | M | 22 | Localiz. | 0-2 dias | Não | Hígido | Saudável | Local | 1 | Sangue | Molhado | Não | Não | Espess. |
| 18 | 44 | F | 16 | Localiz. | + 6 dias | Sim | Cárie | Gengivite | Local | 6 | Pus | Molhado | Sim | Sim | Lesão |
| 19 | 34 | F | 24 | Localiz. | + 6 dias | Não | Rest. | Saudável | Local | +7 | Sangue | Seco | Não | Não | Lesão |
| 20 | 27 | M | 36 | Difusa | 3-5 dias | Sim | Rest. | Gengivite | Difuso | 1 | Sangue | Molhado | Sim | Sim | Espess. |

* Period = características do periodonto; Exsud. = exsudato; Mobil. = mobilidade; Localiz. = localizada; Espess. = espessamento do ligamento periodontal apical, observado no exame radiográfico; Rest. = restauração; M = masculino; F = feminino

APÊNDICE XIII – Estruturas das comunidades microbianas e espécies microbianas isoladas/detectadas em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais.

| | <i>t-RFLP</i> | | | Cultura Microbiana | | PCR | | <i>Nested-PCR</i> | |
|----|----------------------|----------------------|----------------------|--|---|--|--|--|--|
| | Canal Rad. | Abscesso | Ambos | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso |
| C1 | NE: 9,5 ID: 2,94 | NE: 14,5 ID: 2,29 | Nº: 0,50 IS: 0,01 | <i>A. odontolyticus</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>F. magna</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. buccae</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. acnes</i> <i>Prevotella. spp</i> | Nenhum | <i>P. micros</i> <i>P. nigrescens</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. micros</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. tanneriae</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. socranskii</i> | <i>T. socranskii</i> <i>T. amylovorum</i> <i>T. medium</i> |
| C2 | NE: 9,5 ID: 2,56 | NE: 7,5 ID: 2,70 | Nº: 5,5 IS: 0,63 | <i>B. adolescentis</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>F. magna</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. buccae</i> <i>P. disiens</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. micros</i> <i>P. oralis</i> | <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>P. micra</i> <i>P. buccae</i> <i>P. loescheii</i> <i>P. oralis</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> | Nenhum | <i>T. socranskii</i> |
| C3 | NE: 9,5 ID: 2,96 | NE: 23,5 ID: 1,85 | Nº: 4,0 IS: 0,12 | <i>C. bifermentans</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. buccae</i> <i>P. micra</i> | Nenhum | <i>P. micra</i> | <i>P. endodontalis</i> <i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. medium</i> <i>T. vincentii</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. medium</i> <i>T. vincentii</i> |
| C4 | NE: 13,5 ID: 2,47 | NE: 2,5 ID: 3,82 | Nº: 0 IS: 0,01 | <i>A. prevotii</i> <i>E. lenta</i> <i>P. buccae</i> <i>P. micra</i> <i>P. oralis</i> | <i>F. nucleatum</i> <i>P. micra</i> <i>P. oralis</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> | <i>T. socranskii</i> |

* *t-RFLP* = Análise do Polimorfismo do Fragmento Terminal de Restrição; Canal. Rad = amostra do canal radicular; Abscesso = amostra do abscesso; NE = número de espécies; ID = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; Nº = Número de espécies compartilhadas; IS = Índice de similaridade de Bray-Curtis.

APÊNDICE XIII – Estruturas das comunidades microbianas e espécies microbianas isoladas/detectadas em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais (*Continuação*).

| | <i>t</i> -RFLP | | | Cultura Microbiana | | PCR | | Nested-PCR | |
|----|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|---|---|---|---|--|--|
| | Canal Rad. | Abscesso | Ambos | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso |
| C5 | NE: 13,0 ID: 2,59 | NE: 11,0 ID: 2,73 | Nº:5,5 IS: 0,11 | <i>C. difficile</i> <i>Capnocytop</i> spp. <i>F. necrophorum</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>P. propionicum</i> | <i>A. prevotii</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>G. morbillorum</i> | <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> | <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. vincentii</i> |
| C6 | NE: 13,0 ID: 2,51 | NE: 11,0 ID: 2,61 | Nº: 7,5 IS:0,38 | <i>P. disiens</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. oralis</i> <i>C. acetobutyricum</i> <i>G. morbillorum</i> <i>A. prevotii.</i> | Nenhum | <i>E. faecalis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> | <i>P. nigrescens</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>E. faecalis</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. amylovorum</i> <i>T. medium</i> |
| C7 | NE: 23,5 ID: 1,77 | NE: 16,0 ID: 2,22 | Nº: 2,5 IS: 0,14 | <i>A. prevotii</i> <i>B. capillosus</i> <i>C. tetani</i> <i>E. limosum</i> <i>F. magna</i> <i>P. buccae</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. micra</i> | Nenhum | <i>T. forsythia</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> |
| C8 | NE: 33,0 ID: 1,54 | NE: 10,0 ID: 3,03 | Nº: 3,5 IS: 0,10 | <i>B. ureolyticus</i> <i>C. bifermentans</i> <i>C. botullinum</i> <i>P. acnes</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. micra</i> | <i>B. ureolyticus</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>P. buccae</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. gingivalis</i> | <i>F. alocis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> |
| C9 | NE: 9,0 ID: 3,07 | NE: 22,5 ID: 2,08 | Nº: 1,5 IS: 0,09 | <i>F. magna</i> <i>P. micra</i> | Nenhum | <i>P. micra</i> | Nenhum | Nenhum | <i>T. socranskii</i> |

* *t*-RFLP = Análise do Polimorfismo do Fragmento Terminal de Restrição; Canal. Rad = amostra do canal radicular; Abscesso = amostra do abscesso; NE = número de espécies; ID = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; Nº = Número de espécies compartilhadas; IS = Índice de similaridade de Bray-Curtis.

APÊNDICE XIII – Estruturas das comunidades microbianas e espécies microbianas isoladas/detectadas em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais (*Continuação*).

| | <i>t-RFLP</i> | | | Cultura Microbiana | | PCR | | <i>Nested-PCR</i> | |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---|--|--|--|---|--|
| | Canal Rad. | Abscesso | Ambos | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso |
| C10 | NE: 23,5 ID: 3,02 | NE: 16,0 ID: 2,64 | Nº: 5,0 IS: 0,02 | <i>C. albicans</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>F. nucleatum</i> <i>P. disiens</i> <i>P. micra</i> | Nenhum | <i>P. endodontalis</i> | Nenhum | <i>T. socranskii</i> | <i>T. socranskii</i> |
| C11 | NE: 33,0 ID: 2,57 | NE: 10,0 ID: 2,83 | Nº: 2,5 IS: 0,01 | <i>E. faecalis</i> <i>Neisseria</i> spp. | <i>Listeria</i> spp. <i>P. pneumotropica</i> <i>S. lentus</i> <i>S. maltophilia</i> | <i>P. endodontalis</i> <i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> | Nenhum | Nenhum | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> |
| C12 | NE: 9,0 ID: 2,33 | NE: 8,0 ID: 2,98 | Nº: 1,0 IS: 0,47 | <i>E. coli</i> , <i>G. morbillorum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. maltophilia</i> | <i>P. anaerobius</i> <i>S. epidermidis</i> | Nenhum | Nenhum | <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> |
| C13 | NE: 11,0 ID: 3,16 | NE: 10,0 ID: 1,77 | Nº: 0,5 IS: 0,02 | <i>A. naeslundii</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>C. tyrobutyricum</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. oralis</i> <i>Veillonella</i> spp. | <i>B. ureolyticus</i> <i>P. disiens</i> <i>P. acnes</i> <i>Veillonella</i> spp. | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> | <i>P. nigrescens</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. socranskii</i> | <i>T. amylovorum</i> |
| C14 | NE: 9,0 ID: 2,11 | NE: 8,0 ID: 1,38 | Nº: 15,5 IS: 0,05 | <i>E. coli</i> | <i>A. naeslundii</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. acnes</i> | <i>P. endodontalis</i> | Nenhum | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> |
| C15 | NE: 11,0 ID: 3,56 | NE: 10,0 ID: 2,74 | Nº: 0,5 IS: 0,19 | <i>C. tyrobutyricum</i> <i>P. anaerobius</i> <i>P. acnes</i> <i>Veillonella</i> spp. | <i>B. ureolyticus</i> <i>C. tyrobutyricum</i> <i>P. micra</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. oralis</i> | <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. tanneriae</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> |

* *t-RFLP* = Análise do Polimorfismo do Fragmento Terminal de Restrição; Canal. Rad = amostra do canal radicular; Abscesso = amostra do abscesso; NE = número de espécies; ID = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; Nº = Número de espécies compartilhadas; IS = Índice de similaridade de Bray-Curtis.

APÊNDICE XIII – Estruturas das comunidades microbianas e espécies microbianas isoladas/detectadas em amostras pareadas de canais radiculares e abscessos periapicais (*Continuação*).

| | <i>t-RFLP</i> | | | Cultura Microbiana | | PCR | | Nested-PCR | |
|-----|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|--|---|--|--|---|---|
| | Canal Rad. | Abscesso | Ambos | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso | Canal Rad. | Abscesso |
| C16 | NE: 14,5 ID: 3,27 | NE: 9,0 ID: 2,68 | Nº: 3,5 IS: 0,34 | <i>A. prevotii</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>C. bifermentans</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. intermedia</i> | <i>P. acnes</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> | <i>F. nucleatum</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. socranskii</i> | <i>T. maltophilum</i> |
| C17 | NE: 16,0 ID: 3,06 | NE: 5,5 ID: 4,06 | Nº: 1,0 IS: 0,07 | <i>B. ureolyticus</i> <i>E. limosum</i> <i>P. buccae</i> | <i>G. morbillorum</i> <i>P. micra</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. socranskii</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. vincentii</i> |
| C18 | NE: 9,5 ID: 2,45 | NE: 22,5 ID: 2,17 | Nº: 8,0 IS: 0,30 | <i>Neisseria</i> spp. <i>P. buccae</i> <i>P. acnes</i> | <i>A. prevotii</i> <i>C. tyrobutyricum</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. buccae</i> <i>P. acnes</i> | <i>F. alocis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. socranskii</i> | Nenhum |
| C19 | NE: 24,0 ID: 2,71 | NE: 31,0 ID: 3,71 | Nº: 0,5 IS: 0,19 | <i>A. naeslundii</i> <i>E. limosum</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. propionicum</i> | <i>A. naeslundii</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>C. acetobutyricum</i> <i>Clostridium</i> spp. <i>E. limosum</i> <i>F. varium</i> <i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> | <i>P. endodontalis</i> | Nenhum | <i>T. socranskii</i> | <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> |
| C20 | NE: 7,0 ID: 2,19 | NE: 10,5 ID: 2,62 | Nº: 6,0 IS: 0,20 | <i>C. botulinum</i> <i>P. micros</i> | <i>A. prevotii</i> <i>C. botulinum</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. disiens</i> <i>P. acnes</i> | <i>T. forsythia</i> | <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> | <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> <i>T. socranskii</i> | <i>T. amylovorum</i> <i>T. denticola</i> <i>T. medium</i> |

* t-RFLP = Análise do Polimorfismo do Fragmento Terminal de Restrição; Canal. Rad = amostra do canal radicular; Abscesso = amostra do abscesso; NE = número de espécies; ID = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; Nº = Número de espécies compartilhadas; IS = Índice de similaridade de Bray-Curtis.