

MARCOS SERGIO ENDO

***IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO
DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES
COM INSUCESSO ENDODÔNTICO E LESÃO PERIAPICAL***

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

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

**PIRACICABA
2011**

MARCOS SERGIO ENDO

***IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO
DE ENDOTOXINAS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES
COM INSUCESSO ENDODÔNTICO E LESÃO PERIAPICAL***

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

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

**PIRACICABA
2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8^a / 8099

En25i Endo, Marcos Sergio.
Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical / Marcos Sergio Endo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Canal radicular. 3. Microbiologia. 4. Reação em cadeia da polimerase. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Identification of microorganisms and quantification of endotoxins in root canals from teeth with failure endodontic treatment with periapical lesion

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Endodontics. 2. Root canal. 3. Microbiology. 4. Polymerase chain reaction

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, Mitsue Fujimaki Hayacibara

Data da Defesa: 07-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 07 de Fevereiro de 2011, considerou o candidato MARCOS SERGIO ENDO aprovado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes".

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Mitsue Fujimaki Hayacibara".

Profa. Dra. MITSUE FUJIMAKI HAYACIBARA

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Caio César Randi Ferraz".

Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

DEDICATÓRIA

Para conquistarmos algo na vida não basta ter talento, não basta ter força, é preciso também viver um grande amor.

Mozart

Dedico este trabalho...

*...aos meus pais **Mário e Emília Endo**, e à minha irmã **Marisa Endo***

...por me mostrarem o puro sentimento do amor,

...pelo exemplo de vida e superação;

Obrigado a toda minha família!!!

*...à minha namorada **Vivian Sayuri Kitayama***

...pela compreensão nesse período em que não pude estar presente;

...pelo incentivo para realização dos meus sonhos;

...pelo amor, carinho, cumplicidade e confiança;

...ao seu lado sou o homem mais feliz do mundo!!!

*...à **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes** pela humildade e amizade demonstrada nesses anos, pelo exemplo de pessoa e profissional e pela sua excelência no campo do ensino e da pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Um coração feliz é o resultado inevitável de um coração ardente de amor
Madre Teresa de Calcutá

Agradeço...

À **Deus**, no qual me concede a vida e me fortalece todos os dias...

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelos recursos oferecidos durante a execução dessa pesquisa (Processo n°56058-9).

À **Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora dos Programas de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Aos professores da área de Endodontia **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**.

*Aos funcionários **Ana Godoy, Daiane Scutton, Denize Lumena de Pinho, Wanderly Almeida Pavinatto, Geovânia Caldas Almeida** e o ex-funcionário **Adailton dos Santos Lima**.*

*Ao **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo** e a **Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner** pela gentileza em disponibilizar o uso da câmara de anaerobiose do Laboratório de Microbiologia da FOP/UNICAMP.*

***A todos os colegas da área de Endodontia e da Faculdade de Odontologia de Piracicaba:** Adriana de Jesus Soares, Ana Carolina Machado Rocha Lima Caiado, Ana Carolina Mascarenhas, Ariane Cássia Marinho, Carla Klamt, Carlos Augusto Pantoja, Carlos Vieira Júnior, Cláudia Suzuki, Daniel Rodrigo Herrera, Danna Mota Moreira, Douglas Cecchin, Emmanuel Silva, Ericka Tavares Pinheiro, Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Fernanda Barichello Tosello, Fernanda Freitas, Flaviana Bombarda de Andrade, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Gabriel Rocha Campos, Geovânia Caldas Almeida, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Helena Rosa Campos Rabang, Jessica Pignatti, Joelson Brum, Juliana Melo, Juliana Nunes Botelho, Karine Schell Nicastro, Letícia Maria Nóbrega, Maira do Prado, Maraísa Greggio Delboni, Marcos Frozoni, Maria Rachel Monteiro, Morgana Eli Vianna, Naelka Sarmento, Neylla Teixeira Senna, Nilton Vivacqua Gomes, Rogério de Castilho Jacinto, Shaiana Tashi Kawagoe, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Bellato, Thaís Mageste, Vanessa Bellocchio Berber, Wander José da Silva e Wanderson Miguel Maia Chiesa, pelo aprendizado e convívio compartilhado nesses anos.*

*Aos **pacientes** que colaboraram e possibilitaram a realização da pesquisa.*

*Agradeço imensamente a **Profa. Dra. Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Prof. Dr. Francisco Montagner** e **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida** por todas as considerações realizadas na etapa de qualificação deste trabalho.*

*À amiga **Ana Regina Polay** pela acessoria técnica.*

*Aos amigos **Fernanda Signoretti, Fernanda Tosello, Francisco Montagner, Frederico Martinho, João Signoretti, Giselle Abi Rached, Gustavo Signoretti, Maria Rachel Monteiro, Sr. Roque e Sra. Zélia Signoretti** por todos os momentos sinceros e intensos que me fizeram mais feliz em Piracicaba. Um acolhimento especial ...em finais de semana depressivos, datas comemorativas longe de casa etc... Vocês foram minha "bolsa FAMÍLIA" a favor da inclusão social!!! Obrigado!*

*Aos professores e amigos do departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, **Alfredo Franco Queiroz, Ângelo José Pavan, Eduardo Kurihara, Mitsue Fujimaki Hayacibara, Nair Narumi Orita Pavan e Raquel Sano Suga Terada**, que foram a minha inspiração para algum dia realizar o sonho de se tornar um pós-graduando. Serei eternamente grato!!!*

*Aos meus amigos **Ana Regina Casaroto, Ariane Ximenez, Carla Klamt, Carla Malker, Hérica Delalibera, Kelly Micheletti, Jéssica Gerhardt, Juliana Beatriz, Juliana Botelho, Julyano Vieira da Costa, Luciene C. Cruz, Mayko Tanabe, Regiane Teixeira Pereira, Paula Dallazen, Paula Daniele Matheus, Paula Scheibel, Rita de Cássia Maio e Suzana Naomi Matsumoto** que apesar da distância são vocês que me transmitem uma energia especial, e nossas amizades apenas se fortalecem. Tenho um carinho imensurável por todos!!!*

*À família **Kitayama**, que Deus me presenteou na vida. Tenho um enorme carinho e respeito por vocês. Minha família que me acolheu nos momentos felizes e naqueles mais difíceis, enquanto meus pais não estavam ao alcance.*

*Muitíssimo Obrigado **Jorge, Helena e Rodrigo Kitayama**.*

... agradeço à todos que colaboraram para realização deste trabalho.

Muita gente entra e sai de nossas vidas, mas só os verdadeiros sentimentos deixam impressões em meu coração!!!

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se
cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Radiografia periapical de dentes indicados ao retratamento endodôntico: A. Elemento 11 – classificado radiograficamente como obturação insatisfatória. B. Elemento 45 – classificado radiograficamente como obturação satisfatória.....	41
Figura 2	Coleta do canal radicular: A – Profilaxia, B – Descontaminação do campo operatório, C – Abertura coronária, D – Remoção do material obturador do canal radicular, E – Determinação do comprimento de trabalho, F – Localizador apical para realização da odontometria eletrônica, G – Coleta inicial, H – Frasco de vidro (coleta de endotoxinas), I – VMGA III (coleta microbiológica).....	44
Figura 3	Identificação microbiana: A – Cultura (placa “mãe”), B – Câmara de anaerobiose, C – Estufa, D – Cultura pura, E – Teste da catalase, F – Morfologia de Gram, G – Teste bioquímico, H – Teste da oxidase, I – Coloração das fitas do teste da oxidase.....	55
Figura 4	Isolamento microbiano: A – FAA amostra “mãe”, B – Lupa estereoscópica, C – Isolamento bacteriano, D – Cultura pura. Meios seletivos: E – Ágar Mitis Salivarius, F – Ágar MacConkey, G – Ágar Sabouraud Dextrose, H – Ágar m-Enterococcus.....	56

Figura 5	<p>Isolamento do DNA bacteriano. A – QIAamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA), B – Centrífuga, C – Amostras em banho d'água, D – Filtro contendo membrana de sílica para retenção do DNA, E – DNA isolado. Preparo da reação da PCR. F, G, H – Reagentes utilizados para o preparo do <i>mix</i> da PCR: água Milli-Q estéril, dNTPs, Cloreto de magnésio, <i>buffer</i>, Taq DNA <i>polymerase</i>, <i>primers</i>, I – Placa de 96 poços ou microtubos (J) com as amostras distribuídas para receber o <i>mix</i>, L – Termociclador. Visualização do produto da PCR. M – Inserção das amostras nos poços do gel de agarose, N – Fonte de eletroforese, O – Transiluminador de luz ultravioleta, P – Visualização das bandas em gel de agarose através da eletroforese utilizando <i>primer</i> universal.....</p>	60
Figura 6	<p>Curva padrão – utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxinas das amostras.....</p>	65
Figura 7	<p>Teste LAL Pyrogen-5000: A – Tubos de ensaio apirogênicos para preparo da curva padrão, B – Endotoxina <i>E. coli</i> 055:B5, C – Reagente Pyrogen-5000 LAL, D – Tampão de reconstituição Pyrogen-5000 LAL, E – Água LAL reagente, F – Distribuição do reagente Pyrogen-5000 LAL reconstituído na microplaca de 96 poços, G – Leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA), H – Software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA).....</p>	67
Figura 8	<p>Número de espécies e gêneros de bactérias isoladas pelo método de cultura nas cinco coletas em relação ao requerimento gasoso, antes e após PQM e após uso da MIC</p>	72

Figura 9	Número de bactérias isoladas pelo método de cultura microbiana nas cinco coletas em relação ao Gram, antes e após PQM e após uso da MIC.....	73
Figura 10	Porcentagem de microrganismos detectados relacionando cada espécie com o número de canais radiculares analisados (n=15), distribuídos nas diferentes coletas – C1 (primeira coleta): realizada após remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proporções dos reagentes no <i>Master Mix</i>	58
Tabela 2	Espécies microbianas, <i>primers</i> com suas sequências, ciclos de temperatura e comprimento do fragmento amplificado para os nucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	61
Tabela 3	Diluição da endotoxina de <i>E. coli</i> para a construção da curva padrão.....	64
Tabela 4	Características clínicas e radiográficas dos 15 pacientes submetidos ao retratamento endodôntico e uso da medicação intracanal que participaram do estudo.....	70
Tabela 5	Microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC expressos de acordo com as características morfológicas.....	76
Tabela 6	Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de cultura coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	81
Tabela 7	Porcentagens e números de bactérias isoladas pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical em relação à diversidade de espécies, características morfológicas e requerimento gasoso....	84

Tabela 8	Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de cultura da coleta 5 (C5) divididos conforme a medicação intracanal utilizada.....	86
Tabela 9	Porcentagens e números de bactérias isoladas pelo método de cultura após o uso da medicação intracanal (C5) de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical em relação à diversidade de espécies, características morfológicas e requerimento gasoso.....	88
Tabela 10	Microrganismos detectados através do método de PCR nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC, de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	92
Tabela 11	Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de PCR nas coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	94
Tabela 12	Relação bactéria (UFC/mL) e endotoxina (EU/mL) de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, e aspectos clínicos e radiográficos.....	98
Tabela 13	Relação bactéria (UFC/mL) e endotoxina (EU/mL) de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, e distância da guta percha ao ápice, tempo após o tratamento endodôntico e qualidade da obturação do canal radicular.....	98

Tabela 14	Concentração de endotoxina nas coletas realizadas antes e após PQM durante o retratamento endodôntico de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	100
-----------	--	-----

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a microbiota e a presença de endotoxina bacteriana de dentes com insucesso endodôntico antes e após preparo químico-mecânico (PQM) e uso da medicação intracanal (MIC), através do método de cultura microbiana e da reação em cadeia da polimerase (PCR). Este trabalho também se propôs a quantificar endotoxinas e unidades formadoras de colônias (UFCs) dos mesmos dentes, correlacionando seus níveis com aspectos clínicos e radiográficos. Quinze dentes unirradiculares com insucesso endodôntico e lesão periapical foram selecionados. Foram empregados métodos bioquímicos e PCR para identificação dos microrganismos. O teste turbidimétrico LAL (Pyrogent 5000) quantificou a concentração de endotoxina antes e após PQM e MIC. As espécies comumente isoladas pelo método de cultura foram *Gemella morbillorum*, *Haemophilus aphrophilus*, *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces naeslundii*, enquanto que *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Gemella morbillorum* e *Fusobacterium nucleatum* foram detectados frequentemente pelo método de PCR. Foram detectados níveis de endotoxinas e UFCs em todos os casos antes e após PQM. Na coleta inicial foram obtidos valores de endotoxinas e UFCs, mediana – 3,96 EU/mL e $2,57 \times 10^2$ UFC/mL – respectivamente. Correlação positiva entre concentração de endotoxina e radiolucência periapical maior que 5 mm foi observada ($p < 0,05$). PQM foi capaz de reduzir UFCs (99,93%) e endotoxinas (60,6%) (ambos, $p < 0,05$), e foi responsável na maior redução microbiana ao comparar com a MIC. Conclui-se que houve prevalência de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas, embora o método de PCR tenha detectado espécies fastidiosas Gram-negativas. Níveis de endotoxinas de bactérias Gram-negativas estão envolvidos na infecção persistente e mostraram associação com rarefação óssea periapical. Além disso, PQM associado à CLX 2% gel + EDTA 17% foi efetivo na redução de endotoxinas e UFCs presentes na

infecção persistente de dentes com insucesso endodôntico, entretanto não promoveu uma completa remoção.

Palavras-chave: Endodontia, canal radicular, microbiologia, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

This clinical study was conducted to investigate the microbiota and bacteria endotoxin of root canal from teeth with posttreatment apical periodontitis (PAP) by culture and polymerase chain reaction (PCR) before and after chemomechanical preparation (CMP) and after the use of intracanal medications (ICM). Furthermore this work aimed to quantify endotoxin and cultivable bacteria in root canals with PAP correlating their levels with the presence of clinical and radiographic features. Fifteen single root-filled teeth with PAP were sampled. Culture techniques were used to determine the colony-forming unit (CFU). Microorganisms were identified by biochemical tests and PCR. *Limulus* amoebocyte lysate (LAL, turbidimetric Pyrogen 5000) was used to quantify endotoxins before (S1) and after (S2) CMP and after the use of ICM. The bacterial species most frequently isolated were *Gemella morbillorum*, *Haemophilus aphrophilus*, *Enterococcus faecalis* and *Actinomyces naeslundii*; while *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* and *Gemella morbillorum* were frequently detected by PCR. Endotoxin was always detected at S1 and S2. At S1, endotoxin and bacteria were detected in a median value of 3.96 EU/mL and 2.57×10^2 CFU/mL, respectively. A positive correlation was found between the endotoxin and radiolucency area (>5 mm). CMP was effective in reducing bacteria (99.93%) and endotoxin (60.6%) (both $p < 0.05$), and it was responsible for the majority of the microbial reduction when compared with ICM. In conclusion the microbiota of root-filled canals with PAP is predominantly facultative Gram-positive even though fastidious Gram-negative bacteria were detected by PCR. Gram-negative bacterial endotoxins play a role in the PAP and are associated with periapical bone-destruction. Moreover CMP with 2% CHX gel + 17% EDTA was effective in reducing but not complete removing endotoxin and cultivable bacteria from persistent root canal infection.

Key-words: Endodontics, root canal, microbiology, polymerase chain reaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Infecção persistente e/ou secundária: fatores etiológicos associados ao insucesso do tratamento endodôntico.....	5
2.2 Microbiota do canal radicular de dentes com insucesso endodôntico: investigação pelo método de cultura e pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	10
2.2.1 Identificação de microrganismos pelo método de cultura.....	10
2.2.2 Detecção de microrganismos pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	15
2.3 Endotoxina associada à patogênese endodôntica.....	21
2.4 Emprego na terapia endodôntica da substância química auxiliar e da medicação intracanal sobre a redução de microrganismos.....	28
3. PROPOSIÇÃO	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa.....	39
4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	39
4.2 Aspectos clínicos e radiográficos.....	40
4.3 Coletas das amostras.....	42
4.4 Preparo do campo operatório.....	43
4.5 Procedimentos clínicos: abertura coronária, preparo químico-mecânico (PQM), medicação intracanal (MIC) e obturação dos canais radiculares.....	45
4.5.1 Primeira sessão de atendimento.....	45

4.5.2 Segunda sessão de atendimento.....	47
4.5.3 Terceira sessão de atendimento.....	48
4.6 Processamento das amostras.....	50
4.6.1 Caracterização microbiana através da técnica de cultura microbiana.....	50
4.6.1.1 Inoculação, incubação e isolamento bacteriano.....	50
4.6.1.2 Cultivo, isolamento, incubação e identificação dos microrganismos.....	52
4.6.2 Detecção microbiana através da técnica de PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA.....	57
4.6.2.1 Isolamento do DNA bacteriano.....	57
4.6.2.2 Reação de PCR.....	57
4.6.2.3 Eletroforese.....	59
4.6.3 Detecção e quantificação de endotoxina [Teste <i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (LAL) Pyrogent-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)].....	63
4.6.3.1 Procedimentos para execução do teste.....	65
4.6.3.2 Cálculo da concentração de endotoxinas.....	66
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5. RESULTADOS	69
5.1 Aspectos clínicos e radiográficos.....	69
5.2 Caracterização microbiana através da técnica de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	71
5.2.1 Requerimento gasoso dos microrganismos isolados nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	71
5.2.2 Coloração de Gram dos microrganismos isolados nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	72

5.2.3 Identificação e quantificação de espécies e gêneros de microrganismos nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	73
5.2.4 Unidades formadoras de colônias (UFCs) nas diferentes coletas.....	79
5.2.5 Isolamento simultâneo dos microrganismos encontrados em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, de coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	80
5.3 Detecção microbiana através da técnica de PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA de coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	89
5.4 Relação bactérias cultiváveis (UFC/mL) e níveis de endotoxinas (EU/mL) com aspectos clínicos e radiográficos de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	96
5.5 Detecção e quantificação de endotoxina [Teste <i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)] antes e após PQM e após uso da MIC.....	99
6. DISCUSSÃO	101
6.1 Identificação de microrganismos pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	101
6.2 Identificação de microrganismos pelo método de PCR nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	108
6.3 Relação bactérias cultiváveis (UFC/mL) e níveis de endotoxinas (EU/mL) com aspectos clínicos e radiográficos de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	112
6.4 Detecção e quantificação de endotoxina nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC.....	115
7. CONCLUSÃO	119

8. REFERÊNCIAS	121
ANEXO..	143
APÊNDICES.....	145

1 INTRODUÇÃO

As infecções intrarradiculares são as principais causas do insucesso do tratamento endodôntico que é caracterizado pela persistência ou surgimento da lesão periapical após obturação do canal radicular. A microbiota de um dente tratado endodonticamente mostra-se diferente daquela encontrada em dentes com necrose pulpar (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2001), predominando bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas (Peciulienė *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a;b; Gomes *et al.*, 2004). Com o advento dos métodos moleculares, uma alternativa para a identificação de patógenos endodônticos e complementar a cultura microbiana, é a reação em cadeia da polimerase (PCR), capaz de diagnosticar nos casos de insucesso endodôntico uma microbiota mais complexa, detectando também bactérias fastidiosas anaeróbias Gram-negativas (Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004a; Gomes *et al.*, 2005; 2006a; 2008a; Blome *et al.*, 2008).

A particularidade da microbiota encontrada nos canais de dentes tratados endodonticamente deve-se a um processo de seleção dependente da resistência específica de determinados microrganismos ao preparo químico-mecânico (PQM), à medicação intracanal (MIC), e devido à capacidade de sobreviver em condições ecológicas modificadas no interior do sistema de canais radiculares em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas (Sundqvist *et al.*, 1998).

A parte externa da membrana de bactérias Gram-negativas é constituída por lipopolissacarídeos (LPS), um importante fator de virulência, liberado durante a multiplicação ou morte celular, que pode iniciar e/ou exacerbar a resposta inflamatória (Dahlén & Bergenholtz, 1980; Barthel *et al.*, 1997), e estar associado à reabsorção óssea nas periodontites apicais (Horiba *et al.*, 1991;

Martinho *et al.*, 2010a). Para realizar uma desinfecção ideal do sistema de canais radiculares, o tratamento endodôntico não depende apenas da remoção de microrganismos e seus substratos (Silva *et al.*, 2002) mas também na inativação ou eliminação de LPS. Estudos detectaram LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares analisados antes e após PQM de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical (Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009a). Altas concentrações de endotoxinas estão relacionadas com dor espontânea (Jacinto *et al.*, 2005) e sintomatologia clínica (Martinho & Gomes, 2008) em infecções endodônticas primárias; sugerindo associação entre presença de LPS no canal radicular e o desenvolvimento de lesão periapical. Faltam estudos na literatura que revelem os níveis de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Dessa forma, é oportuno verificar nesses casos se há uma possível correlação desses níveis com os aspectos clínicos e radiográficos.

Na tentativa de controlar e eliminar o processo infeccioso, alguns trabalhos mostraram a importância da medicação intracanal com o objetivo de potencializar a sanificação do sistema de canais radiculares e impedir que os microrganismos se multipliquem no intervalo entre as sessões de tratamento (Byström & Sundqvist, 1981; 1983; Byström *et al.*, 1985; Shuping *et al.*, 2000). A medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] e suas associações tem sido amplamente utilizada devido às suas propriedades físicas e biológicas (Gomes *et al.*, 2002a; 2002b; Zerella *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006b; Ercan *et al.*, 2007; Souza-Filho *et al.*, 2008). O Ca(OH)₂ além de ser utilizado no combate a microrganismos (Gomes *et al.*, 2002a; 2002b), também tem sido preconizado para a neutralização das endotoxinas bacterianas (Buck *et al.*, 2001; Tanomaru *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2007).

Dessa forma, o presente trabalho visa estudar a microbiota e níveis de endotoxinas nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, correlacionando com os aspectos clínicos e radiográficos do dente envolvido e verificar a

suscetibilidade desses microrganismos e endotoxinas ao preparo químico-mecânico e a medicação intracanal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecção persistente e/ou secundária: fatores etiológicos associados ao insucesso do tratamento endodôntico

O objetivo do tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical é a eliminação e/ou redução significativa de microrganismos, e prevenção da reinfecção do sistema de canais radiculares. Bactérias e seus produtos são considerados os principais agentes etiológicos de patologias pulpares e periapicais (Kakehashi *et al.*, 1965; Möller *et al.*, 1981; Gomes *et al.*, 1996). A persistência da infecção devido a falha do tratamento endodôntico (Nair *et al.*, 1990a; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998) e a recontaminação bacteriana causada pela microinfiltração coronária (Torabinejad *et al.*, 1990; Saunders & Saunders, 1994; Ray & Trope, 1995) são fatores relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico.

A infecção do canal radicular é um processo dinâmico no qual, várias espécies bacterianas estão associadas, nos diferentes estágios deste processo. Os fatores mais importantes que direcionam o desenvolvimento da periodontite apical são disponibilidade de nutrientes, nível de oxigênio e o pH local no interior do canal radicular (Sundqvist, 2003). A periodontite apical de origem endodôntica é um processo inflamatório localizado na região perirradicular, o qual pode ser iniciado e mantido por um processo infeccioso (Kakehashi *et al.*, 1965). O resultado entre a ação de microrganismos e células de defesa do hospedeiro leva a uma destruição dos tecidos periapicais (Nair, 2000). Na existência prévia da periodontite apical foram observados maiores porcentagens na permanência da infecção após o tratamento endodôntico (Sjögren *et al.*, 1990; Hoskinson *et al.*, 2002; Chugal *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2006).

Apesar de a infecção intrarradicular ser indiscutivelmente o principal fator associado ao insucesso endodôntico (Nair *et al.*, 1990a; Siqueira, 2001), é importante salientar que existem outros fatores que podem causar a radioluscência apical, como: cistos verdadeiros (Nair *et al.*, 1993; Nair *et al.*, 1996), reação de corpo estranho (Nair *et al.*, 1990b; Sjögren *et al.*, 1995), tecido cicatricial (Bhaskar, 1966), ou infecção extrarradicular (Tronstad *et al.*, 1987).

O fator microbiano é apontado como a maior causa de falhas do tratamento endodôntico. Espécies bacterianas podem aderir às paredes do canal radicular, aglomerar e formar comunidades organizadas em biofilme, capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos (Nair *et al.*, 1999; Distel *et al.*, 2002). Algumas bactérias localizadas em complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares como túbulos dentinários, ramificações, istmos, canais laterais e/ou irregularidades evadem da ação dos instrumentos e substâncias químicas utilizadas durante o tratamento endodôntico (Haapasalo & Ørstavik, 1987; Siqueira & Uzeda, 1996; Goldberg *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2005). As falhas podem decorrer devido um diagnóstico incorreto, deficiência técnica e falta de habilidade profissional. A porcentagem de casos de insucesso é significativa, sendo que as áreas não atingidas durante o preparo químico-mecânico (PQM) são favoráveis à manutenção de conteúdo séptico-necrótico, contribuindo para o insucesso da terapia endodôntica (Lin *et al.*, 1991; 1992). Outros problemas comuns que podem levar ao fracasso endodôntico incluem a falta de controle asséptico durante os procedimentos clínicos, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, obturações e restaurações coronárias inadequadas ou ausentes (Cheung, 1996).

O estabelecimento de um adequado selamento endodôntico objetiva impedir que microrganismos e/ou endotoxinas atinjam os tecidos apicais e periapicais, o que constitui um dos principais fatores para o sucesso dessa terapia (Hauman & Love, 2003). Aproximadamente 60% dos fracassos endodônticos são causados, aparentemente, pela obturação incompleta da cavidade pulpar

(Antonopoulos *et al.*, 1998), que é diretamente influenciado pela escolha da técnica de obturação (a frio ou termoplastificada) (Schilder, 1967; Molven *et al.*, 2002), pelo tipo de cimento e sua manipulação (Pécora *et al.*, 2002), além do uso de substâncias quelantes ao final dos procedimentos de limpeza e modelagem (Guerisoli *et al.*, 2002; Torabinejad *et al.*, 2002). Uma obturação hermética do canal radicular previne a saída de irritantes pelo forame apical ou canais laterais, preservando a integridade do ligamento periodontal (Lifshitz *et al.*, 1983). Em situações em que a obturação é realizada com material biologicamente incompatível, com adaptação e densidade do material obturador inadequados, e com selamento deficiente na região apical pode causar comprometimento do prognóstico da terapia endodôntica (De Deus, 1992). A principal forma de suprimento de substratos para bactérias em regiões do canal radicular dá-se através da percolação de fluidos decorrentes dos tecidos perirradiculares, via forame apical, e pelo espaço existente entre o material obturador e as paredes do canal, resultante de uma falha do selamento apical. Estes fluidos contêm principalmente glicoproteínas, que servem de fonte nutricional para bactérias sacarolíticas e proteolíticas. Esse fracasso associado a um selamento apical inadequado geralmente é observado a longo prazo pela manutenção de restos necróticos e bactérias no interior do sistema de canais radiculares (Lopes & Siqueira, 2004).

Maniglia *et al.* (2007) observaram que a longevidade do tratamento endodôntico depende da estabilidade dimensional do material obturador. Neste trabalho pode ser destacado algumas considerações: a) técnicas de termocompactação (10 segundos) e compressão vertical causaram degradações na guta-percha, gerando perda de massa molar; b) aquecimentos excessivos do polímero guta-percha causaram sua degradação, gerando a formação de produtos voláteis e perda de massa molar; c) a guta-percha (trans 1,4-poliisopreno) degradou lentamente no interior do canal radicular, observado após 15 anos e este processo foi influenciado por fatores externos como a infecção endodôntica.

Essa degradação química (oxidação e perda de massa molar) do material obturador compromete o selamento apical, causando a reinfecção local, e a necessidade do retratamento endodôntico independentemente do quadro sintomático.

Nos casos em que o curativo de demora ou material obturador ficarem expostos ao meio bucal, a recontaminação ocorre de fato, o que possivelmente levará ao insucesso do tratamento endodôntico (Siqueira & Uzeda, 1996; Shipper *et al.*, 2005). A contaminação de dentes tratados endodonticamente também ocorre, através da infiltração coronária dos mesmos, via restaurações temporárias ou definitivas deficientes (Siqueira *et al.*, 1999; Adib *et al.*, 2004). Ray & Trope (1995) avaliaram radiograficamente 1010 dentes tratados endodonticamente correlacionando a qualidade da obturação e da restauração coronária. A qualidade técnica da restauração coronária foi significativamente mais importante que a qualidade do tratamento endodôntico para a determinação do reparo da região periapical.

Ao observar o insucesso do tratamento endodôntico, independente da sua etiologia, o retratamento do canal radicular é preferível à cirurgia periapical ou exodontia (Bergenholtz *et al.*, 1979; Lovdahl, 1992; Çaliskan & Sen, 1996; Weiger *et al.*, 2000). A Associação Americana de Endodontia (Quality Assurance Guidelines), propõem critérios clínicos e radiográficos de avaliação do sucesso ou fracasso endodôntico. São considerados insucessos do tratamento endodôntico, dentes com sintomas persistentes, fístula ou edema, desconforto à palpação ou à percussão, evidência de fratura dental irreparável com excessiva mobilidade ou perda óssea periodontal ativa e perda de função do dente. Radiograficamente os critérios determinantes do insucesso são aumento da espessura do ligamento periodontal, ausência de reparo ósseo no interior da lesão ou aumento da rarefação, ausência de neoformação de lâmina dura, presecção de rarefações ósseas em áreas onde previamente não existiam e reabsorções ativas associadas a outros sinais radiográficos de insucesso.

O tempo de acompanhamento clínico-radiográfico após o tratamento endodôntico para a determinação do sucesso dessa terapia varia de 4 anos pós-tratamento (Engström, 1964; Quality Assurance Guidelines 1987; Sjögren *et al.*, 1997), 2 anos (Bender *et al.*, 1966; Bergenholtz *et al.*, 1979), 1 ano e meio (Friedman *et al.*, 1995) e até mesmo 1 ano (Reit, 1987).

A taxa de sucesso do retratamento de um dente com periodontite apical é de 66% (Allen *et al.*, 1989; Hepworth & Friedman, 1997), ou seja menor que um dente ainda não tratado que varia de 85 a 96% (Swartz *et al.*, 1983; Sjögren *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993). Molander *et al.* (1998) sugeriram que esse prognóstico ruim em dentes indicados ao retratamento endodôntico se deve a dificuldade na eliminação da microbiota específica.

Sjögren *et al.* (1990) avaliaram 356 dentes após 8 a 10 anos do tratamento endodôntico, e encontraram 96% de sucesso em dentes sem lesão periapical e 86% naqueles com necrose pulpar e lesão. Smith *et al.* (1993) em estudo retrospectivo analisaram 821 dentes após 5 anos do tratamento endodôntico, e encontraram uma taxa de sucesso de 84,29%. Friedman *et al.* (1995), encontraram um índice de sucesso de 97% em casos de dentes sem lesões periapicais, e 63,2% em dentes com lesões. Imura *et al.* (2007) observaram que de 624 dentes indicados ao retratamento convencional, a taxa de sucesso foi de 85,9%, detectando maiores porcentagens em dentes anteriores e pré-molares quando comparados aos molares.

2.2 Microbiota do canal radicular de dentes com insucesso endodôntico: investigação pelo método de cultura e pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

2.2.1 Identificação de microrganismos pelo método de cultura

A infecção endodôntica secundária é causada por microrganismos que não estavam presentes na infecção endodôntica primária, mas que invadiram o interior do canal radicular em algum momento após o tratamento endodôntico. A infecção persistente é causada por microrganismos que participavam da infecção endodôntica primária ou secundária e, que de alguma maneira resistiram aos procedimentos antimicrobianos intracanaís e sobreviveram aos períodos escassos de nutrientes em canais tratados (Siqueira, 2002).

Estudos revelaram que a microbiota de um dente tratado endodonticamente difere daquela encontrada normalmente em dentes necrosados e não tratados (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2004). Enquanto a necrose dos canais radiculares caracteriza-se por uma infecção polimicrobiana com proporções equivalentes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, prevalecendo bactérias anaeróbias estritas (Möller, 1966; Möller *et al.*, 1981; Sundqvist, 1992; Wasfy *et al.*, 1992; Peciulienė *et al.*, 2001); a microbiota de um dente indicado ao retratamento endodôntico predomina bactérias Gram-positivas, número limitado de microrganismos e espécies anaeróbias facultativas superiores às anaeróbias estritas (Molander *et al.*, 1998; Peuciliene *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b; Gomes *et al.*, 2004).

Molander *et al.* (1998) detectaram 117 espécies bacterianas em 68 (68%) de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical. Na maioria dos casos foram encontradas de 1 a 2 espécies (85%), predominando bactérias anaeróbias facultativas (69%). Frequentemente foram isoladas espécies do gênero *Enterococcus* spp. (32% dos dentes investigados).

Sundqvist *et al.* (1998) verificaram a microbiota de 54 dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical persistente. Os dentes foram retratados e acompanhados por um período de cinco anos. Foram realizadas três coletas microbiológicas; a primeira após a desobturação dos canais radiculares; a segunda antes do preparo dos canais radiculares e a terceira após o preparo e a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] por 7-14 dias. Os autores detectaram crescimento de microrganismos em 44% das amostras (24/54), principalmente uma única espécie predominando bactérias Gram-positivas. O isolado mais comumente encontrado foi de *Enterococcus faecalis* (37,5% dos casos). A taxa de sucesso no retratamento endodôntico foi de 74%, entretanto nos canais onde foi identificada a presença de *E. faecalis* o índice de sucesso foi de 66%. Diante do exposto concluíram que a microbiota de um dente tratado endodonticamente difere de dentes não tratados. A infecção no momento da obturação e o tamanho da lesão periapical influenciaram negativamente no prognóstico.

Segundo Peciulienė *et al.* (2001) foram isolados 33 (83%) microrganismos de 40 dentes incluídos no estudo. Fungos (*Candida albicans*) foram encontrados em 6 casos (18%) sempre associados às bactérias. Bacilos entéricos Gram-negativos facultativos foram encontrados em três casos *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, sempre associados à presença de *E. faecalis* (21 dentes – 64%). Desses 21 dentes, 11 apresentavam *E. faecalis* como cultura pura. O número total de microrganismos isolados foi de 40 UFC a 7×10^7 UFC e o tamanho da lesão (maior diâmetro) foi de 2 mm a 13 mm. A média de unidades formadoras de colônias (UFCs) para as lesões com diâmetro de 2 a

4mm foi de $1,4 \times 10^7$, para as lesões de 5 e 6 mm foi de $4,8 \times 10^6$, e para as lesões de 7 a 13 mm foi de $2,4 \times 10^7$. Após o preparo químico-mecânico foi detectado crescimento bacteriano em 10 casos de 33. Foram encontrados *E. faecalis* em seis casos, em cinco dentes esse microrganismo apresentava em cultura pura. Fungos não foram detectados nessa segunda coleta. O número de bactérias após o PQM mostrou-se sempre abaixo de 1% do total obtido na primeira coleta.

Cheung & Ho (2001) detectaram a presença de microrganismos em doze (66,7%) de dezoito amostras de dentes assintomáticos com lesão periapical, indicados ao retratamento endodôntico. O total de colônias foi de 0 a $2,3 \times 10^5$ UFC/mL (mediana: $1,2 \times 10^3$ UFC/mL). Cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos foram os microrganismos mais frequentemente isolados, especialmente os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. *E. faecalis* não foi detectado. Radiograficamente a rarefação periapical apresentou entre $0,44 \text{ mm}^2$ a $38,19 \text{ mm}^2$ (média de $6,8 \text{ mm}^2$). Não houve correlação entre o tamanho da lesão periapical e UFC/mL ($p > 0,05$). Nenhuma associação foi encontrada entre a radiolucidez periapical e o número de espécies isoladas do canal radicular. Entretanto, em quatro casos caracterizados como obturação ruim apresentaram elevado número de espécies.

Hancock *et al.* (2001) investigaram a composição da microbiota de 54 dentes com insucesso do tratamento endodôntico, os quais 34 apresentaram crescimento microbiano (61,1%). Foi obtido um total de 57 espécies bacterianas com uma média de 1,69 espécies por dente e predominância de Gram-positivos (80,4%). As espécies mais comumente encontradas foram *E. faecalis*, assim como os gêneros *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., e *Streptococcus* spp. A porcentagem de *E. faecalis* foi de 30,3% (10 casos em 33) nos casos que tiveram crescimento bacteriano e 18,5% (10 casos de 54) de toda a amostra. *Candida albicans* foi detectada em um caso. Os autores observaram também que mais de um terço dos casos foram caracterizados como monoinfecções. A falta de

nutrientes cria condições no ambiente que bactérias Gram-positivas sobrevivem sem sinergismo com outras bactérias. Nesse mesmo trabalho avaliaram também o efeito da distância da guta-percha do ápice, tamanho da lesão, grupo dentário, presença/ausência de pino, e a qualidade da restauração sobre o crescimento microbiano. A distância da guta-percha em relação ao ápice e o tamanho da lesão apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Quando a distância foi maior que 2 mm ou o tamanho da lesão maior que 5 mm, houve um aumento de bactérias viáveis. Observou-se um crescimento bacteriano em 75% (9 de 12) dos canais onde a distância ficou entre 2 e 4 mm, e em 78,5% (11 de 14) dos canais com tamanho maior que 5 mm. Além disso, afirmaram que o número de espécies bacterianas isoladas dos dentes tratados endonticamente está relacionado com a qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamento endodôntico inadequado, e que não tiveram uma limpeza efetiva, apresentaram maior número de espécies bacterianas quando comparados aos dentes bem tratados; provavelmente devido a um ambiente similar ao existente em um dente infectado e não tratado. No estudo de Sundqvist *et al.* (1998), um caso observado radiograficamente com tratamento endodôntico ruim, apresentou uma microbiota semelhante de um dente necrosado não tratado.

Pinheiro *et al.* (2003b) identificaram a microbiota nos casos de insucesso endodôntico e associaram as características clínicas com a presença dessas bactérias. Foram realizadas coletas microbiológicas após a desobturação de 60 canais radiculares, e detectaram 51 (85%) culturas positivas, 1 ou 2 espécies por canal, havendo predominância de bactérias Gram-positivas (83,3%) anaeróbias facultativas (57,4%). *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada. O gênero *Peptostreptococcus* spp., esteve associado com sintomatologia clínica ($p < 0,01$). Foram encontradas associações significantes entre dor ou história de dor e infecção polimicrobiana ou anaeróbios ($p < 0,05$); dor a percussão e *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* ($p < 0,05$); fístula e

Streptococcus spp. ($p < 0,001$) ou *Actinomyces* spp. ($p < 0,01$); ausência de selamento coronário e *Streptococcus* spp. ou *Candida* spp. (ambos com $p < 0,01$).

Adib *et al.* (2004) identificaram bactérias de canais de dentes tratados endodonticamente com lesão periapical persistente e infiltração coronária. Oito dentes recém extraídos foram seccionados transversalmente em três partes: coroa e dois segmentos da raiz (coronário e apical), que foram coletados individualmente. Foram isolados microrganismos de todos os dentes, totalizando 252 cepas. Houve predominância de bactérias anaeróbias facultativas (189/252, 75%), seguido de anaeróbios estritos (43/252, 17%) e aeróbios (14/252, 5,6%) e *Candida* spp. (6/252, 2,4%). Frequentemente foram detectadas cepas Gram-positivas (209/252, 82,1%). Os gêneros mais prevalentes foram *Staphylococcus* spp. (48/252, 19%), *Streptococcus* spp. (44/252, 17,5%), *Enterococcus* spp. (20/252, 7,9%) e *Actinomyces* spp. (20/252, 7,9%). Em relação aos anaeróbios, o gênero *Peptostreptococcus* spp. foi detectado em 20 (6,7%) de 252 dentes. Na maioria dos dentes foram encontrados os gêneros *Staphylococcus* spp. (6/8 dentes) e *Enterococcus* spp. (5/8 dentes). A grande quantidade de microrganismos isolados nos canais radiculares se deve principalmente às infiltrações coronárias e, também à sensibilidade da técnica de coleta e cultura utilizadas.

Enterococcus faecalis é uma espécie anaeróbia facultativa comensal frequentemente detectada no canal radicular de dentes com infecção endodôntica secundária (Sirén *et al.*, 1997; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciuliene *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2001; Peciuliene *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004c; Gomes *et al.*, 2008a), e pode invadir o canal radicular através da microinfiltração coronária ou por uma contaminação durante tratamento endodôntico prévio (Cheug & Ho, 2001). Muitos estudos mostraram resistência do *E. faecalis* frente ao Ca(OH)_2 (Byström *et al.*, 1985; Haapasalo & Ørstavik, 1987; Sirén *et al.*, 1997).

Fungos podem ser isolados de dentes com insucesso do tratamento endodôntico (Nair *et al.*, 1990a; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). *Candida albicans* é a espécie de fungos mais comumente detectada nos casos de retratamento endodôntico (Siqueira & Rôças, 2009), e sua presença pode ser resultado de contaminação proveniente da cavidade bucal (Waltimo *et al.*, 1997). Baumgartner *et al.* (2000) através do uso da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) detectaram fungos em 21% dos dentes com periodontite apical. Fungos (*Candida albicans*) foram encontrados em 6 casos (18%) sempre associados às bactérias (Peciulienė *et al.*, 2001). Egan *et al.* (2002) relataram que a presença de fungos nos canais radiculares estava associada com a sua presença na saliva, e que houve alguma comunicação dos canais radiculares com o meio bucal, através de infiltrações coronárias ou fístulas, nos casos onde fungos foram isolados.

Baseado nos trabalhos que utilizaram a metodologia por cultura na identificação microbiológica nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, observaram uma microbiota com número limitado de espécies e predominantemente Gram-positivos (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a; 2003b). Entretanto, técnicas moleculares revelaram uma microbiota mais complexa nesses casos de retratamento (Rôças *et al.*, 2004b; Siqueira & Rôças, 2004; Schirmeister *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008a).

2.2.2 Detecção de microrganismos pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em 1985, um grupo de cientistas da *Cetus Corporation* padronizou uma técnica por meio da qual eram geradas, a partir do DNA genômico, grandes

quantidades de um fragmento específico de DNA, correspondendo a genes presentes como cópia única no genoma. Essa metodologia, baseada em uma reação de replicação *in vitro*, consiste em uma reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), na qual se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial. A técnica de PCR é tão sensível que uma única molécula de DNA pode, em teoria, servir como molde para amplificação. Assim, um gene presente no genoma como cópia única pode ser amplificado a partir de DNA genômico complexo, podendo ser posteriormente visualizado como uma banda discreta, constituída por moléculas de DNA, por meio da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo (Azevedo *et al.*, 2003).

Segundo Azevedo *et al.* (2003), o princípio da PCR envolve três etapas básicas, requeridas na reação de síntese de qualquer DNA, que são repetidas por várias vezes, em ciclos: (1) Desnaturação térmica do DNA molde. (2) Anelamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde. (3) Polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro (dNTP) como substrato da reação de polimerização.

Rolph *et al.* (2001) investigaram 41 amostras clínicas coletadas de 15 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão perirradicular e de 26 dentes com tratamento endodôntico prévio, através do método convencional de cultura e PCR 16S rRNA. No método de cultura e PCR foram isolados microrganismos em 44% e 68%, respectivamente. Cinco casos de infecções refratárias analisados pelo método de PCR revelaram espécies dos gêneros *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella*. *Enterococcus* spp. não foram isolados nos cinco casos estudados. Os autores concluíram que técnicas moleculares podem detectar a presença de bactérias que não foram isoladas pelo método de

cultura, e pode ser útil na identificação de uma diversidade bacteriana relacionada às infecções endodônticas, inclusive a presença de bactérias não cultiváveis.

Siqueira & Rôças (2004) investigaram 19 espécies microbianas através do método de PCR de 22 canais de dentes com lesão periapical persistente indicados ao retratamento endodôntico. Todas as amostras apresentaram pelo menos uma espécie microbiana. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente (17/22, 77% dos casos). Outras espécies detectadas foram *Pseudoramibacter alactolyticus* (12/22, 52%), *Propionibacterium propionicum* (11/22, 52%), *Dialister pneumosintes* (10/22, 48%) e *Filifactor alocis* (10/22, 48%). *Candida albicans* foi encontrada em 9% (2/22) das amostras. A maioria das amostras mostraram infecção mista, com uma média de 4 espécies por canal (1 – 11). Para os casos em que a guta-percha da obturação estava a 2 mm do ápice radiográfico, a média do número de espécies foi 3 (1 – 5); enquanto nos casos em que essa distância foi maior que 2 mm, a média foi de 5 espécies (2 – 11). Essa diferença mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A quantidade de DNA variou de 30 a 730 ng/ μ L.

Foschi *et al.* (2005) analisaram através da PCR, a presença de bactérias (*Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*) em infecções de canais radiculares. Associações de bactéria com sintomatologia clínica foram investigadas. Foram selecionados 62 dentes com infecção endodôntica. Desses casos, 71% apresentaram infecção endodôntica primária, e 29% infecção secundária. *E. faecalis* foi detectado em 60% de dentes com periodontite apical crônica e em 72% de dentes com infecção secundária. Foi observada associação significativa de periodontite apical crônica e infecção endodôntica secundária com a presença de *E. faecalis* ($p < 0,01$). *T. denticola* foi frequentemente detectado nos casos de sintomatologia com radioluscência periapical ($p < 0,01$). Os autores concluíram que o insucesso do tratamento endodôntico estava associado com a detecção de *E. faecalis*.

Gomes *et al.* (2005) avaliaram pelo método de cultura microbiana e PCR a presença de quatro bactérias produtoras de pigmento negro (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, e *Prevotella nigrescens*) em infecções endodônticas. As coletas foram realizadas de 50 dentes com necrose pulpar e 50 dentes com insucesso endodôntico. Espécies bacterianas foram detectadas pela cultura e PCR, 13/100 e 50/100, respectivamente. Os microrganismos cultiváveis representaram 11/50 (22%) na infecção primária e 2/50 (4%) na infecção secundária. Por outro lado, a detecção das espécies pelo PCR na infecção primária e secundária foi de 32/50 (64%) e 18/50 (36%). *P. gingivalis* foi raramente isolado por cultura (1%), entretanto detectada frequentemente por PCR (38%). *P. endodontalis* não foi isolado por cultura, apenas foi detectada por PCR em 25% das amostras. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens* foram mais frequentemente identificados nos casos de infecção endodôntica primária que a secundária. Tanto o método de cultura quanto PCR, detectou em alta frequência a presença de microrganismos produtores de pigmentos negros.

Gomes *et al.* (2006a) investigaram em casos de infecção endodôntica primária (n=50, IEP) e secundária (n=50, IES) bactérias anaeróbias estritas, tais como *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola*. Os resultados mostraram *F. alocis* (23 canais com IEP e 12 canais com IES), *T. forsythia* (12 canais com IEP e 3 canais com IES) e *T. denticola* (19 canais com IEP e 12 canais com IES). Foram observadas associações entre IEP e a presença de *F. alocis* e *T. forsythia* (ambos $p < 0,05$). Também foram encontradas associações entre: dor e *F. alocis*; edema e *F. alocis*; dor à percussão e *T. forsythia*; mobilidade e *T. forsythia* e *T. denticola*; canais úmidos e *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola*; exsudato purulento e *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola*; abscesso e *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola* (todos $p < 0,05$). Os autores concluíram que *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola* parecem estar associados com sinais e sintomas clínicos. Além disso, *F. alocis* e *T. forsythia* foram mais frequentemente detectados em IEP que na IES.

Schirrmeister *et al.* (2007) investigaram a presença de microrganismos por cultura e *nested* PCR em dentes assintomáticos tratados endodonticamente com lesão periapical. Utilizaram um protocolo de desinfecção com NaOCl 2,5%, EDTA 17%, CLX 2% seguido da medicação intracanal de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂]. Após a remoção do material obturador, detectaram microrganismos em 60% (12/20) pelo método de cultura e 65% (13/20) por PCR. Na quantificação de colônias observaram de 0 a $7,8 \times 10^7$ UFC/mL (mediana: $3,5 \times 10^3$ UFC/mL) e de $3,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^9$ UFC/mL (mediana: $1,5 \times 10^5$ UFC/mL) em relação a cultura de aeróbios e anaeróbios, respectivamente. Em 4 das 20 amostras iniciais foram detectados DNA de *E. faecalis*. Após o preparo do canal radicular associado com a irrigação de NaOCl 2,5% e EDTA 17% não houve crescimento de microrganismos, assim como após o uso da CLX 2%. Entretanto após a medicação intracanal foi detectado microrganismos em dois dentes.

Gomes *et al.* (2008a) investigaram através da PCR nove espécies bacterianas em 45 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical, e correlacionaram essas espécies com sintomatologia clínica. A espécie mais prevalente foi *E. faecalis* (77,8%), seguido por *Peptostreptococcus micros* (51,1%). *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* foram detectadas em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1% das amostras, respectivamente. Além disso, do total das amostras detectaram *Filifactor alocis* em 26,7%, *Treponema denticola* em 24,4% e *Tannerella forsythia* em 4,4%. *T. denticola* e *P. micros* apresentaram associação com dor à percussão ($p < 0,05$). *P. nigrescens* esteve associada com dor espontânea e abscesso ($p < 0,05$). *P. endodontalis* e *P. nigrescens* mostraram associação com exsudato purulento ($p < 0,05$).

Blome *et al.* (2008) estudaram em dentes humanos, a presença e o número de espécies específicas, assim como a carga bacteriana total de dentes com periodontite apical crônica utilizando o método da PCR em tempo real (*Real-time* PCR). Quarenta pacientes foram divididos em infecção primária (n=20) e

infecção secundária (n=20). Foram obtidas amostras antes e após o PQM dos canais radiculares, e após 14 dias de medicação intracanal com Ca(OH)₂. Análise através da PCR em tempo real possibilitou a quantificação bacteriana total e de nove espécies selecionadas (*P.m.*, *Peptostreptococcus micros*; *P.e.*, *Porphyromonas endodontalis*; *T.d.*, *Treponema denticola*; *T.f.*, *Tannerella forsythia*; *F.n.*, *Fusobacterium nucleatum*; *P.g.*, *Porphyromonas gingivalis*; *P.i.*, *Prevotella intermedia*; *A.a.*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; *E.f.*, *Enterococcus faecalis*). Os canais radiculares dos dentes com infecção primária apresentaram uma carga bacteriana total significativamente maior que os dentes indicados ao retratamento ($p < 0,05$). Inicialmente, a média bacteriana total nos casos de retratamento foi de $2,1 \times 10^6$ e após o preparo do canal radicular reduziu para $3,6 \times 10^4$ e após a medicação intracanal para $1,4 \times 10^5$, mostrando diferença significativa em relação à coleta inicial. Os autores verificaram que após o PQM do canal radicular foi observado uma redução bacteriana de 97,3% na infecção endodôntica secundária e 99,9% na infecção endodôntica primária. *P. m.* e *P. e.* foram as espécies mais frequentemente detectadas em ambos os grupos, entretanto *A. actinomycetemcomitans* não foi encontrado. A diversidade bacteriana no canal radicular foi maior no grupo da infecção primária. Foram encontradas associações positivas em relação à frequência de detecção simultânea de espécies bacterianas na coleta inicial entre: *P.m.* e *P.e.*, *P.g.*, *F.n.*, e *T.f.*; *T.f.* e *T.d.*; *T.f.* e *F.n.*; *P.e.* e *P.g.*; *P.e.* e *F.n.* ($p < 0,05$, para todos).

Gomes *et al.* (2008b) investigaram *Gemella morbillorum* por cultura e *nested* PCR em infecções endodônticas primárias (n=50) e secundárias (n=50). Do total de 100 canais radiculares, através do método de cultura e PCR foram identificadas 23 e 77 espécies, respectivamente. *Gemella morbillorum* foi detectada em infecções endodônticas primárias e secundárias pelo método de cultura em 19 de 50 (38%) e 4 de 50 (8%), respectivamente; por outro lado pela análise de PCR obteve 41 de 50 (82%) e 36 de 50 (72%), respectivamente. Os

autores destacaram a maior frequência desse microrganismo na infecção primária, e seu alto número obtido pelo método molecular.

Rôças *et al.* (2008) estudaram a presença e níveis relativos de 28 espécies bacterianas de canais radiculares com tratamento endodôntico prévio, utilizando a análise de *checkerboard hybridization* de captura reversa. PCR foi utilizado para detectar *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Foi detectado DNA bacteriano em todas as amostras. Vinte de 28 espécies da sonda genética foram detectadas em pelo menos uma amostra. Os microrganismos frequentemente detectados incluíram: *Streptococcus* spp. (47%), *Lactobacillus* spp. (35%), *Dialister invisus* (29%), *Eubacterium infirmum* (29%), *Prevotella intermedia* (29%), *Selenomonas sputigena* (29%), *Synergistes* clone BA121 (29%), e *Treponema denticola* (29%). Somente seis cepas foram detectadas em níveis acima de 10^5 . Desses, *Streptococcus* spp. e *T. denticola* foram os mais prevalentes. O número de espécies detectadas por amostra variou entre 1 a 18 (média de 5,2). Através do PCR foi detectado *E. faecalis* (47%) e *C. albicans* (6%). A maioria dos casos apresentou uma infecção mista, *E. faecalis* quando presente não foi a espécie dominante. Outras espécies bacterianas foram detectadas e podem estar envolvidas na etiologia da periodontite apical pós-tratamento endodôntico.

2.3 Endotoxina associada à patogênese endodôntica

Endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS) está presente em bactérias Gram-negativas, e é composto por polissacarídeos, fosfolipídeos e polipeptídeos. LPS, em termos moleculares, é formado por um grupo bastante heterogêneo. É constituído de uma âncora hidrofóbica chamada lipídio A, responsável pela atividade endotóxica da molécula. Em sua parte central há diferentes cadeias de

açúcares e no outro extremo cadeias de polissacarídeos (Antígeno O) (Bos *et al.*, 2007).

LPS é liberado durante a multiplicação ou morte celular, causando efeitos biológicos (Barthel *et al.*, 1997), os quais levam à reação inflamatória e reabsorção óssea nas periodontites apicais (Yamasaki *et al.*, 1992). As endotoxinas não agem diretamente sobre os órgãos, induzem respostas do sistema imune. Caracterizam-se como ativadores policlonais, responsáveis por fenômenos que iniciam a resposta inflamatória, tais como: quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), liberação de enzimas lisossomais de PMNs, promove a liberação de colagenase dos macrófagos, ativação do sistema complemento, aumento da temperatura corporal, atração de osteoclastos (Farber & Seltzer, 1988), alteração da estrutura e função de vários órgãos e células, assim como das funções metabólicas e hemodinâmicas (Martich *et al.*, 1993).

Endotoxinas liberadas por bactérias Gram-negativas têm sido detectadas em infecções primárias dos canais radiculares (Schein & Schilder, 1975; Dahlén & Bergenholtz, 1980; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008). Altos níveis de endotoxinas têm sido associados com o desenvolvimento de dor espontânea (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2005;) e sintomatologia clínica como dor à percussão (Jacinto *et al.*, 2005; Martinho & Gomes, 2008) e dor à palpação (Jacinto *et al.*, 2005). O acúmulo de componentes bacterianos na região do periápice com alto potencial inflamatório (LPS), pode estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos e monócitos/macrófagos locais (Wilson *et al.*, 1996). As infecções crônicas envolvem diferentes citocinas inflamatórias (Stashenko *et al.*, 1990) como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-8.

A alta toxicidade de endotoxinas foi observada *in vivo* (Dahlén & Bergenholtz, 1980; Pitts *et al.*, 1982) no desenvolvimento de inflamação periapical

e reabsorção óssea alveolar, e in vitro (Tani-Ishii *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2004), estimulando células na liberação de citocinas inflamatórias que causam a destruição tecidual (Lin *et al.*, 2001). Essa atividade endotóxica faz com que essa molécula tenha de ser neutralizada e/ou removida do interior de canais infectados durante o tratamento endodôntico, para auxiliar no processo de reparo dos tecidos periapicais.

Foram realizados estudos in vitro e in vivo envolvendo a quantificação de LPS em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, assim como estudos após o preparo químico-mecânico, mostrando a eficácia dos procedimentos endodônticos na redução e/ou eliminação do conteúdo endotóxico e com objetivo de encontrar métodos para neutralização de seus efeitos tóxicos.

Buck *et al.* (2001) investigaram in vitro a ação das soluções irrigadoras utilizadas no tratamento endodôntico e do hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] sobre o LPS bacteriano, através da técnica de espectrometria de massa e cromatografia gasosa. Em tubos de vidro apirogênicos foram misturados 25 µL de LPS + 0,5 mL de água apirogênica + 0,5 mL do irrigante a ser testado: água, EDTA 15%, etanol 95%, clorexidina (CLX) 0,12%, CLX 0,12% + hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,6%, CLX 0,12% + NaOCl 2,6% + etanol 95% e NaOCl 2,6% sozinho. Cada irrigante foi exposto por 30 minutos e para o Ca(OH)₂ os períodos foram de 1, 2 e 5 dias. A inativação do LPS foi medida através da quantificação de ácidos graxos liberados. O Ca(OH)₂ por 5 dias, e a associação de CLX 0,12% + NaOCl 2,6% + etanol 95% hidrolizaram a porção ativa da endotoxina (lipídio A), enquanto que as demais soluções experimentais apresentaram pouco ou nenhuma capacidade de inativação.

Khabbaz *et al.* (2001) investigaram a presença de endotoxina na polpa de dentes (n=28) com cárie sintomáticos (n=15) e assintomáticos (n=13), e de cinco dentes hígidos como controle. Em todos os casos, a polpa foi pesada com aproximadamente 8 mg. A quantificação de endotoxina foi realizada através do

teste cromogênico Lisado Amebócito Limulus (LAL-1000). Endotoxinas foram detectadas no tecido pulpar de todos os dentes sintomáticos cariados com uma média de 0,15773 ng/mL, por outro lado nos dentes assintomáticos essa média foi de 0,10723 ng/mL. No grupo controle não foi detectada endotoxina. A concentração de endotoxina no tecido pulpar de dentes sintomáticos foi significativamente maior que nos dentes assintomáticos. A presença de endotoxina na polpa de dentes cariados indica um papel importante na patogênese e sintomatologia pulpar, sendo que quanto maior a concentração de endotoxina, maior a severidade da dor.

Tanomaru *et al.* (2003) avaliaram o efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras e do Ca(OH)_2 sobre LPS (*Escherichia coli*) em canais radiculares de cães. Foram utilizados 140 pré-molares divididos em: 1) NaOCl 1%, 2) NaOCl 2,5%, 3) NaOCl 5%, 4) CLX 2%, 5) solução salina, 6) LPS mantido em todo o período experimental, 7) preparo biomecânico com solução salina e posterior medicação intracanal com Ca(OH)_2 (Calen). Após 60 dias, os cães foram sacrificados e realizados avaliações do infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal, reabsorção cementária e óssea. Os resultados histopatológicos mostraram maior infiltrado inflamatório, maior espessura do ligamento periodontal, e maior reabsorção cementária e óssea nos grupos 1 a 6 quando comparado com o grupo 7 [medicação intracanal com Ca(OH)_2]. Os autores concluíram que o preparo biomecânico associado às soluções irrigadoras não inativaram o LPS, entretanto o Ca(OH)_2 como medicação intracanal pareceu inativar os efeitos induzidos pela endotoxina in vivo.

Hong *et al.* (2004) verificaram a ação do LPS sobre a indução de reabsorção óssea nos tecidos periapicais, avaliando a polimixina B no tratamento dessas lesões. O LPS foi isolado de dois patógenos endodônticos (*Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis*), este foi inserido em macrófagos de ratos para liberar interleucina 1 alfa (IL-1 alfa) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa). Os resultados mostraram uma combinação do LPS com o aumento da

estimulação. A polimixina B inibiu significativamente esses efeitos. O LPS estimulou a expressão gênica da matriz de metaloproteinase 1 (MMP-1). Os anticorpos anti IL-1 alfa e TNF-alfa apresentaram diminuição de seus efeitos. A administração de polimixina B reduziu as extensões de reabsorção óssea e simultaneamente o número do fator produtor de macrófagos. Concluíram que a liberação de LPS dos canais radiculares infectados estimula a síntese de IL-1 alfa e TNF-alfa de macrófagos. Estas citocinas pré-inflamatórias regulam a produção de MMP-1 pelos macrófagos, as quais induzem reabsorções periapicais.

Jacinto *et al.* (2005) quantificaram a concentração de endotoxina de 50 canais radiculares de dentes necrosados, e investigaram a relação entre tal concentração com sinais e/ou sintomas de origem endodôntica. Para a quantificação de endotoxina em cada amostra foi utilizado o método cromogênico QCL-1000. Além disso, através do método de cultura microbiana, foram registrados os números de UFCs de cada amostra. Todas as amostras apresentaram crescimento de microrganismos e presença de endotoxinas, com uma média de 10^2 a 5×10^6 , e 2390 – 22100 EU/mL, respectivamente. Nos casos associados à dor espontânea, a média de UFCs foi de $1,43 \times 10^6$, enquanto nos assintomáticos foi de $9,1 \times 10^4$. A concentração média de endotoxina nos casos com dor espontânea foi de 18540 EU/mL, enquanto que nos casos assintomáticos a média foi de 12030 EU/mL. Foi encontrada correlação positiva entre a concentração de endotoxina e os casos sintomáticos. Os autores concluíram que as endotoxinas estão presentes em altas concentrações nos canais radiculares de dentes sintomáticos.

Oliveira *et al.* (2007) avaliaram o efeito de irrigantes endodônticos sobre endotoxinas em canais radiculares. Foram selecionados 98 dentes humanos extraídos. Endotoxina de *Escherichia coli* foi utilizada para inoculação em 84 canais unirradiculares, sendo ampliados e divididos em sete grupos (n=14) de acordo com a solução irrigante preconizada. Os grupos foram NaOCl 2,5% (G1); NaOCl 5,25% (G2); CLX 2% (G3); Ca(OH)₂ 0,14% (G4); polimixina B (G5);

controle positivo (solução salina, G6) e controle negativo. Foram coletadas amostras dos canais radiculares, imediatamente e após 7 dias. A detoxificação da endotoxina foi mensurada pelo teste do Lisado de Amebócito de Limulus e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Em ambas as coletas, os grupos G4, G5 e G7 apresentaram resultados significativamente melhores que os grupos G1, G2, G3 e G6 ($p < 0,05$). Concluíram que as substâncias do grupo G4 e G5 inativaram a endotoxina nos canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B. O NaOCl e a CLX não inativaram as endotoxinas.

Vianna *et al.* (2007) investigaram em 24 dentes necrosados a concentração de endotoxinas e bactérias cultiváveis em diferentes momentos: antes (C1) e após (C2) o PQM através do uso da CLX 2% gel como substância química auxiliar, e após 7 dias de medicação intracanal (C3) [pasta de Ca(OH)_2 , CLX 2% gel e a associação de ambas], com o objetivo de verificar os efeitos antimicrobianos e anti-endotóxicos dos procedimentos endodônticos. Foi utilizado o teste cromogênico do Lisado de Amebócito de Limulus para mensuração de endotoxina, e a cultura microbiana para determinar a redução de UFC. Endotoxinas e bactérias foram detectadas em todas as amostras (C1), variando de 62,93 a 214,56 EU/mL e 4×10^5 a $2,6 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. A média de redução de endotoxina e bacteriana após o PQM foi de 44,4% e 99,96%, respectivamente. Nenhuma melhora foi obtida pela utilização da medicação intracanal por uma semana.

Martinho & Gomes (2008) em um estudo clínico, quantificaram endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com necrose pulpar, antes e após o PQM, utilizando como solução irrigante NaOCl 2,5%. Além disso, correlacionaram endotoxina e bactéria cultivável com a presença de sintomatologia clínica. Foram selecionados 24 canais radiculares com lesão periapical. As amostras foram coletadas antes (C1) e após (C2) o PQM. O método de cultura foi utilizado na determinação de bactérias cultiváveis através de UFCs; e para quantificação de

endotoxina fez-se uso do Lisado de Amebócitos de *Limulus*. Todas as amostras iniciais apresentaram bactérias cultiváveis e endotoxinas, com mediana de $2,64 \times 10^5$ UFC/mL e 139 EU/mL, respectivamente. Altos níveis de LPS foram encontrados em dentes com sintomatologia clínica ($p < 0,05$). A redução bacteriana e de endotoxina em C2 obteve uma média de 99,78% e 59,99%, respectivamente. Os autores concluíram que o PQM com NaOCl 2,5% foi mais efetivo contra bactérias que endotoxinas na infecção do canal radicular, e observaram uma associação significativa entre altos níveis de endotoxinas e sintomatologia clínica.

Gomes *et al.* (2009a) estudaram o efeito do PQM com NaOCl 2,5% e CLX 2% gel na redução e/ou eliminação de LPS. Foram analisados 54 canais radiculares de dentes com necrose pulpar, divididos em 2 grupos de acordo com o irrigante. As amostras foram coletadas antes (C1) e após o PQM (C2). A quantificação de endotoxina foi realizada através do método LAL. Foi detectada endotoxina em todas as amostras. Em C1 os valores das medianas foram de 272 EU/mL (17 – 696 EU/mL) (NaOCl 2,5%) e 152,46 (71,92 – 214,57 EU/mL) (CLX 2% gel), enquanto C2 foi de 86 EU/mL (3 – 881 EU/mL) (NaOCl 2,5%) e 85 EU/mL (23 – 174 EU/mL) (CLX 2% gel). A porcentagem da redução de endotoxina foi de 57,98 (NaOCl 2,5%) e 47,126 (CLX 2% gel). Tanto o grupo utilizando como irrigante o NaOCl 2,5% quanto CLX 2% gel não apresentaram efetividade na eliminação de endotoxina em infecções endodônticas primárias.

Signoretta (2009) avaliou a influência da CLX 2% gel sobre a capacidade de redução de endotoxinas desta medicação intracanal. Para quantificação de endotoxinas foram utilizados dentes humanos, previamente preparados, contaminados, preenchidos com as medicações. Os medicamentos foram inseridos dentro dos canais de 30 dentes [GI – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + soro, GII – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CLX, GIII – CLX], e após permanecerem por 14 dias foram removidos com irrigação abundante. Este lavado foi submetido à quantificação da endotoxina remanescente através do teste cromogênico quantitativo QLC-1000. Análise estatística foi realizada com os testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). A maior redução

de endotoxinas foi observada no grupo da CLX 2% gel (91,63%), seguida de sua associação com o Ca(OH)_2 (88,76%) e depois o Ca(OH)_2 + soro fisiológico (82,13%). Não houve diferença estatística entre a CLX 2% gel e sua associação com o Ca(OH)_2 , quanto à redução da quantidade de endotoxinas dentro do canal radicular. Concluiu-se que a CLX 2% gel melhorou a capacidade do Ca(OH)_2 em reduzir o conteúdo de endotoxinas dos canais radiculares in vitro.

2.4 Emprego na terapia endodôntica da substância química auxiliar e da medicação intracanal sobre a redução de microrganismos

A desinfecção do canal radicular pode ser obtida por meios químicos e mecânicos. O PQM do canal radicular diminui de forma significativa o número de microrganismos da infecção endodôntica. Mecanicamente o controle microbiano envolve o uso de instrumentos manuais e/ou rotatórios, já o meio químico é representado pelo uso de agentes antimicrobianos durante e após a instrumentação. Uma redução bacteriana significativa pode ser verificada após o preparo mecânico (Byström & Sundqvist, 1981; Dalton *et al.*, 1998; Shuping *et al.*, 2000, Mc Gurkin-Smith *et al.*, 2005). Entretanto, em áreas inacessíveis aos instrumentos endodônticos, como canais laterais, acessórios, regiões de istmos e delta apical, o controle de microrganismos que resistem ao PQM dependem da ação das soluções irrigadoras e da medicação intracanal.

É importante ressaltar a necessidade do emprego de substâncias químicas auxiliares com o intuito de promover uma redução significativa dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que, auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (Byström & Sundqvist, 1983). As substâncias

mais comumente utilizadas para esta finalidade são hipoclorito de sódio (NaOCl), clorexidina (CLX) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

O gluconato de clorexidina possui amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, apresenta biocompatibilidade e habilidade em adsorver-se à mucosa e ao dente com liberação prolongada gradual e em níveis terapêuticos (substantividade) (Gomes *et al.*, 2001; 2003a; Dametto *et al.*, 2005). Quando usada em altas concentrações sua ação antimicrobiana se dá pela ligação de moléculas catiônicas às paredes celulares das bactérias que são carregadas negativamente, ocorre o rompimento da parede celular interferindo no mecanismo de transporte e favorece a coagulação do citoplasma pela alta afinidade às proteínas. Em baixas concentrações, substâncias de baixo peso molecular escapam pela membrana citoplasmática, causando efeito bacteriostático (Lindskog *et al.*, 1998). A CLX tem sido preconizada como irrigante (Delany *et al.*, 1982; Ferraz *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2006; Ferraz *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009a; Vianna & Gomes, 2009) e medicação intracanal (Siqueira & Uzeda, 1997; Gomes *et al.*, 2001; 2003a; 2003b; 2006b; Vianna *et al.*, 2007; Souza-Filho *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009b).

Ferraz *et al.* (2001) empregaram o uso da CLX em base gel como substância química auxiliar no tratamento de canais radiculares, e observou atividade antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos comumente encontrados nas infecções endodônticas, além de apresentar capacidade lubrificante durante o preparo mecânico. Outra vantagem da CLX gel quando comparada com a líquida é a diminuição da formação de *smear layer*.

Pelo fato de bactérias residuais e/ou resistentes ao preparo do canal radicular poderem interferir no sucesso do tratamento endodôntico, alguns autores recomendam o uso de medicação intracanal na tentativa de eliminar esses microrganismos persistentes (Neelakantan *et al.*, 2007). Os objetivos do emprego

de medicações intracanalais são: promover a eliminação de bactérias que sobreviveram ao PQM, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou reinfecção por microrganismos da saliva, reduzir a inflamação perirradicular, solubilizar a matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar a exsudação persistente e a reabsorção inflamatória externa, e estimular o reparo por tecido mineralizado (Leonardo, 2004).

O gluconato de clorexidina além de atuar como substância química auxiliar devido suas propriedades já conhecidas, também tem sido utilizada como uma alternativa de medicação intracanal, e estudada tanto *in vitro* (Heling *et al.*, 1992; Lenet *et al.*, 2000; Basrani *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003a; 2003b) quanto *in vivo* (Barbosa *et al.*, 1997; Vianna *et al.*, 2006). Quando usada como medicação intracanal, a CLX, aplicada com dispositivos de liberação controlada lenta e rápida, foi mais eficiente que o Ca(OH)_2 , que se igualou ao grupo controle, na eliminação de *Enterococcus faecalis* em diversas profundidades em túbulos dentinários e na prevenção da reinfecção desses túbulos após recontaminação dos espécimes (Heling *et al.*, 1992).

O hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] é empregado rotineiramente como medicação intracanal e tem sido atribuído a esta substância atividade antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2002a; 2002b), inibição de reabsorção dental, indução de reparo pela formação de tecido duro e capacidade de dissolução tecidual (Nerwich *et al.*, 1993). A medicação intracanal a base de Ca(OH)_2 pode prevenir a reinfecção do canal radicular e interromper o suprimento de nutrientes para as bactérias remanescentes. Sua propriedade antibacteriana se deve ao fato do estabelecimento de um pH altamente alcalino (12,5 aproximadamente) dentro do canal radicular, que possibilita a destruição da membrana citoplasmática, desnaturação enzimática e proteica, e a ruptura do DNA bacteriano (Siqueira & Lopes, 1999). Esse elevado pH faz com que a maioria dos microrganismos não consiga sobreviver (Gomes *et al.*, 2006b). Estudos mostraram que a medicação intracanal com Ca(OH)_2 pode ser complementar ao PQM e resultar em um canal

radicular livre de bactérias cultiváveis antes da obturação (Engström *et al.*, 1964; Sjögren *et al.*, 1997; Waltimo *et al.*, 2005; Fabricius *et al.*, 2006). A associação do Ca(OH)_2 com um veículo, permite a dissociação iônica do composto em íons cálcio e hidroxila, uma vez que suas propriedades são dependentes dessa ionização. Alguns veículos podem ser destacados como biologicamente ativo (clorexidina), e inerte (soro fisiológico) (Lopes & Siqueira, 2004).

Safavi & Nichols (1994), demonstraram que o Ca(OH)_2 tem a capacidade de hidrolisar a porção lipídica do LPS bacteriano, promovendo a degradação dele, além de alterar as propriedades biológicas. Entretanto, o Ca(OH)_2 tem se mostrado ineficaz contra *E. faecalis* (Stevens & Grossman, 1983; Byström *et al.*, 1985; Haapasalo & Ørstavik, 1987; Reit & Dahlén, 1988; Safavi *et al.*, 1990; Siqueira & Uzeda, 1996; Gomes *et al.*, 2003a; 2003b; 2006b; 2009b), pois esse microrganismo tem a capacidade de sobreviver em canais radiculares sozinho e sem auxílio de outra bactéria (Fabricius *et al.*, 1982a; Sirén *et al.*, 1997), assim como em um ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes (Figdor, 2002). A colonização de *E. faecalis* nos casos de retratamento ocorre durante o tratamento endodôntico, devido uma técnica asséptica inadequada ou entre as sessões pelo selamento deficiente (Hancock *et al.*, 2001).

Shuping *et al.* (2000) avaliaram a redução bacteriana nos canais radiculares após instrumentação rotatória e irrigação com NaOCl 1,25%, assim como após 7 dias de medicação intracanal utilizando o Ca(OH)_2 . Quarenta e dois dentes com periodontite apical aguda foram examinados. A coleta inicial (C1) mostrou infecção em todos os canais avaliados; 61,9% e 92,5% dos casos apresentaram cultura negativa após a instrumentação (C2) e após medicação intracanal (C3), respectivamente. Os autores concluíram que a instrumentação rotatória com NaOCl é um passo importante na redução microbiana dos canais radiculares, entretanto não foi possível eliminar microrganismos por completo dos canais radiculares. Os autores sugeriram a utilização da medicação intracanal por 7 dias, a qual reduziu ainda mais a microbiota dos canais radiculares.

Gomes *et al.* (2003a) avaliaram o efeito da CLX 2% gel e Ca(OH)_2 como medicação intracanal, em períodos de tempos de 1, 2, 7, 15 e 30 dias. Os canais radiculares de dentes bovinos foram infectados com *Enterococcus faecalis*. Os grupos compreenderam diferentes medicações intracanal: CLX 2% gel; Ca(OH)_2 + polietilenoglicol 400, CLX 2% gel + Ca(OH)_2 . A CLX 2% gel sozinha inibiu totalmente o crescimento bacteriano das amostras de dentina infectada após 1, 2, 7 e 15 dias. O Ca(OH)_2 + polietilenoglicol permitiu crescimento microbiano em todos os tempos experimentais. A combinação da CLX gel 2% com Ca(OH)_2 foi efetivo após 1 e 2 dias, entretanto houve redução da sua atividade antibacteriana entre 7 e 15 dias. Os autores concluíram que a CLX 2% gel sozinha foi mais efetiva contra *E. faecalis* que o Ca(OH)_2 ($p < 0,05$).

Gomes *et al.* (2003b) avaliaram *in vitro* o tempo necessário para recontaminação de canais radiculares preenchidos com medicação intracanal [Ca(OH)_2 , CLX 2% gel ou pela associação de ambos] e selados coronariamente. Foram utilizados 75 pré-molares inferiores, divididos em: (1) CLX (sem selamento coronário), (2) Ca(OH)_2 (sem selamento), (3) Ca(OH)_2 + CLX 2% gel (sem selamento), (4) CLX 2% gel (com selamento), (5) Ca(OH)_2 (com selamento), (6) Ca(OH)_2 + CLX 2% gel (com selamento), (7) sem medicação intracanal e com selamento coronário, (8) sem medicação intracanal e sem selamento coronário. As coroas ficaram imersas em saliva e BHI e apenas os ápices dos dentes em teste estavam em contato com o meio de cultura líquido estéril. Diariamente foi verificada a turbidez do meio incubado. Os medicamentos que apresentaram maior barreira física foram aqueles que continham selamento coronário e dentre estes, os melhores em ordem decrescente foram o Ca(OH)_2 (17,2 dias), CLX (13,5 dias) e associação de ambos (11,9 dias). Os autores concluíram que o selamento coronário não previne a infiltração de microrganismos através dos canais radiculares contendo medicação intracanal.

Zerella *et al.* (2005) compararam o efeito da pasta de Ca(OH)_2 + CLX 2% e Ca(OH)_2 + H_2O na desinfecção do canal radicular de dentes com insucesso

endodôntico e lesão periapical. Do total de 40 dentes tratados endodônticamente na primeira sessão ambos os grupos apresentaram crescimento microbiano. Após o uso da medicação intracanal 12 de 40 (30%) mostraram cultura positiva antes da obturação do canal radicular, sendo 4 do grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX } 2\%$, e 8 do grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}$, ambos com $p > 0,05$. Apesar disso o grupo da associação do $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX } 2\%$ não detectaram crescimento de *E. faecalis* após o uso da medicação, sabendo que inicialmente cada grupo apresentava quatro casos positivos para o microrganismo. O grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}$ ainda restaram dois casos positivos ao *E. faecalis*.

Gomes *et al.* (2006b) investigaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da CLX 2% gel, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e associação de ambos. Foram utilizados o método da difusão em ágar e contato direto. A CLX apresentou os maiores halos de inibição, sendo necessário um minuto ou menos para eliminar os microrganismos testados. A pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ teve ação apenas em contato direto e necessitou de 30 minutos a 6 horas para inibir o crescimento microbiano. Já a associação dos dois medicamentos foi necessária de 30 a 60 minutos para inibir o crescimento dos microrganismos. Os autores concluíram que a combinação dos dois medicamentos diminuiu a atividade antimicrobiana da CLX, entretanto, aumentou a atividade antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Ercan *et al.* (2007) avaliaram *in vivo* a efetividade da associação entre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e CLX 1% como medicação intracanal durante o retratamento endodôntico de casos com lesão periapical. Foram selecionados 70 pacientes, dos quais 59 apresentavam tratamento endodôntico prévio e 11 haviam sido submetidos à cirurgia periapical. Após a realização dos procedimentos endodônticos e irrigação com CLX 2%, a medicação intracanal [$\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX } 1\%$] foi inserida. Após seis semanas foi realizada a troca da medicação intracanal periodicamente, caso o dente ainda apresentasse sintomático. Através da análise clínica e radiográfica dos casos foi observado um reparo completo de 41 (64%) dentes, incompleto 9 (14%), e insucesso 14 (22%). Para o reparo completo o

tempo variou entre 6 a 36 meses. O tamanho da lesão e cirurgia periapical prévia não influenciaram no prognóstico. Os autores concluíram que a associação do Ca(OH)_2 e CLX 1% pode ser uma opção para desinfecção do canal radicular nos casos de retratamento com lesão periapical.

Wang *et al.* (2007) investigaram a redução bacteriana in vivo da CLX 2% gel durante o preparo do canal radicular e a associação do Ca(OH)_2 + CLX 2% gel como medicação intracanal. Foram selecionados 43 pacientes com periodontite apical, e 4 pacientes com pulpite irreversível como controle negativo. As amostras foram coletadas antes (C1), após instrumentação rotatória (C2) e depois de duas semanas de medicação intracanal (C3). Os resultados mostraram que em quatro amostras não houve crescimento microbiano em C1, os quais foram excluídos. Em todas as outras verificaram presença bacteriana em C1; nos momentos C2 e C3 corresponderam 10,3% (4/39) e 8,3% (4/36), respectivamente. Ao comparar C1 e C2 foi observado uma redução bacteriana significativa ($p < 0,001$) diferente de C2 e C3 ($p = 0,692$). Diante do exposto, concluíram que a CLX 2% gel é um efetivo agente irrigante e que a medicação intracanal não melhorou a redução bacteriana das amostras analisadas.

Manzur *et al.* (2007) avaliaram a atividade antibacteriana da medicação intracanal com Ca(OH)_2 , CLX 2% gel e a associação entre ambos; em dentes com periodontite apical crônica. Trinta e três canais foram instrumentados e divididos em três grupos de acordo com a medicação intracanal testada. Foram obtidas amostras do canal radicular antes (C1) e após a instrumentação (C2); e após 7 dias da inserção da medicação intracanal (C3). A média de unidades formadoras de colônias em C1 foi $3,13 \times 10^7$ (2×10^2 a $2,11 \times 10^8$, mediana: $3,26 \times 10^6$), em C2 foi $1,37 \times 10^3$ (0 a $2,54 \times 10^4$, mediana: 0) e em C3 foi $2,98 \times 10^2$ (0 a $6,4 \times 10^3$, mediana: 0). Esses valores mostraram que C2 e C3 foram significativamente menores ($p < 0,05$) que em C1. Entre a segunda e terceira coleta foi observado uma redução de 24% no grupo do Ca(OH)_2 , 46% (CLX) e 99% [CLX + Ca(OH)_2]. Todos os grupos apresentaram atividade antibacteriana.

Gomes *et al.* (2009b) avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana de medicações intracanáis [CLX 2% gel, Ca(OH)₂ + soro fisiológico, Ca(OH)₂ + CLX 2% gel, óxido de zinco + CLX 2% gel + Ca(OH)₂] na superfície externa de dentes na presença ou ausência de cimento. Concluíram que, os canais preenchidos com CLX 2% gel obtiveram a melhor ação antimicrobiana, seguida por CLX 2% gel + Ca(OH)₂, óxido de zinco + CLX 2% gel + Ca(OH)₂ e por último Ca(OH)₂ + soro fisiológico.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo são:

- 1.** Caracterizar a microbiota dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical antes e após o preparo químico-mecânico e uso de medicamentos intracanaís, através do método de cultura e da técnica PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA.
- 2.** Quantificar a concentração de endotoxina no canal radicular de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical antes e após o preparo químico-mecânico e uso de medicamentos intracanaís.
- 3.** Verificar possíveis correlações entre microrganismos e níveis de endotoxinas com aspectos clínicos e radiográficos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), protocolo nº 139/2008 (**ANEXO I**), que satisfizeram as condições de inclusão. Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**APÊNDICE I**), conforme as normas vigentes no referido Comitê de Ética em pesquisa, antes de participar deste estudo.

4.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

Foram analisadas 500 fichas de encaminhamento pertencentes a pacientes dos Cursos de Atualização e Especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). Os casos que necessitavam de retratamento endodôntico, indicado através da descrição da condição clínica na ficha de encaminhamento e que apresentavam exames radiográficos onde se constatava a presença de lesão periapical foram selecionados (n=37).

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Os pacientes previamente selecionados foram contactados e após avaliação clínica prévia 15 dentes unirradiculares com insucesso endodôntico, lesão periapical, dor espontânea ausente e restauração permanente foram incluídos no presente estudo. Nenhum dos casos selecionados apresentava tratamento endodôntico inferior a 2 anos, doença periodontal, fístula, edema, fratura radicular e

exposição da câmara pulpar; fazia uso de antifúngicos e antibióticos (< 3 meses); impossibilidade de isolamento absoluto e inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho.

4.2 Aspectos clínicos e radiográficos

Os pacientes responderam um questionário referente aos dados pessoais, à história médica, dentária e do tratamento endodôntico anterior.

Durante o exame clínico foram anotadas informações sobre o dente a ser retratado e sua condição atual em relação à qualidade da restauração, ao tipo da restauração ou coroa, à presença ou ausência de cárie, infiltração coronária e fratura. Verificaram-se presença ou ausência de dor, natureza da dor, história de dor prévia, dor à percussão (horizontal e vertical) e à palpação, presença ou ausência de edema dos tecidos periapicais, fístulas, mobilidade dental e bolsa periodontal. Todas essas características clínicas referentes ao dente investigado foram anotadas na ficha clínica de cada paciente.

De acordo com Pinheiro (2003a;b) e Delboni (2009), na radiografia periapical (**Figura 1**) foram avaliados os seguintes aspectos:

- a. Presença de imagem de cárie sob a restauração sugerindo uma infiltração coronária. Considerou-se restauração “boa” quando adaptada radiograficamente, e “ruim” quando havia falha na margem e presença de espaços vazios entre o material restaurador e o dente;
- b. Limite da obturação dos canais radiculares, sendo que este foi classificado em intervalos de ≤ 2 mm e > 2 mm do ápice e sobre-obturados;

- c. Qualidade do tratamento endodôntico: considerado “bom” quando a guta-percha apresentava compactada e radiograficamente não se observava áreas radiolúcidas na massa obturadora ou entre o material obturador e a parede do canal, com limite da obturação entre 0-2 mm do ápice. Foi considerado “ruim” quando havia radiolucidez na massa obturadora, guta-percha não compactada, espaços vazios na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, ou com limite da obturação maior que 2 mm do ápice radiográfico;
- d. Tamanho da lesão periapical relacionado ao dente tratado endodonticamente, divididos nas categorias ≤ 5 mm e > 5 mm;
- e. Presença ou ausência de pino intrarradicular;
- f. Presença ou ausência de prótese definitiva ou provisória.

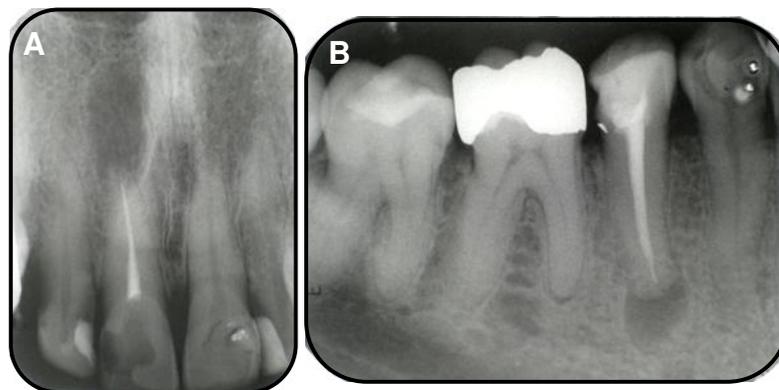


Figura 1. Radiografia periapical de dentes indicados ao retratamento endodôntico: **A.** Elemento 11 – classificado radiograficamente como obturação insatisfatória. **B.** Elemento 45 – classificado radiograficamente como obturação satisfatória.

4.3 Coletas das amostras

As coletas clínicas (**Figura 2**) do canal radicular de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical foram realizadas na Clínica de Especialização. As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia Endodôntica da FOP/UNICAMP. Utilizou-se técnicas assépticas, instrumentos esterilizados e apirogênicos (livre de endotoxinas) para coleta das amostras. O método utilizado neste estudo foi adaptado daquele descrito anteriormente por Gomes *et al.* (1994a; 1996; 2005), Pinheiro *et al.* (2003a;b) e Delboni (2009).

As coletas de endotoxina e microbiológica dos canais radiculares foram realizadas com cones de papel absorventes estéreis e apirogênicos introduzidos no comprimento de trabalho, permanecendo nesta posição por 60 segundos. Casos em que o canal apresentava-se seco, este foi umedecido com soro fisiológico estéril e apirogênico, para assegurar uma coleta adequada. O primeiro cone foi armazenado em frasco de vidro vazio selado com papel alumínio, ambos estéreis e apirogênicos, para quantificação de endotoxina. Outros quatro cones foram inseridos em um tubo plástico tipo *Eppendorf* contendo 1,0 mL de meio de transporte *Viability Medium Göteborg Ágar – VMGA III* (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993) (**APÊNDICE II**) para análise microbiológica (cultura e PCR).

As amostras para análise de endotoxina foram armazenadas em freezer (-20°C), como recomendado pelo fabricante, para posterior processamento. Os *Eppendorfs* contendo as amostras foram imediatamente transportados para o Laboratório de Microbiologia Endodôntica para processamento microbiológico por cultura, que ocorreu imediatamente após o término do procedimento clínico, não ultrapassando 4 horas. Os tubos contendo o conteúdo remanescente foram congelados em freezer -20°C para futura análise pelo método de PCR.

4.4 Preparo do campo operatório

Antes da intervenção, foi realizada a descontaminação da face externa do paciente com clorexidina (CLX) 2% gel e anestesia local na região do dente envolvido. Este recebeu uma profilaxia com pedra pomes e água. Fez-se o isolamento absoluto e o vedamento da interface coroa-lençol de borracha com auxílio do cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP) para evitar uma infiltração salivar e de fluido gengival. Partiu-se para descontaminação (**Figura 2**) do grampo, lençol de borracha, arco de Ostby e da porção coronária do dente com *swabs* estéreis e umedecidos em água oxigenada 30% (v/v), seguido de NaOCl 2,5% por 30 segundos cada. A neutralização destes compostos foi realizada com solução estéril de tiosulfato de sódio 5% (Möller, 1966). Para confirmar a descontaminação do campo operatório foi coletada uma amostra com *swab* estéril o qual foi plaqueado em *Fastidious Anaerobe Ágar* (FAA, Lab M, Bury, UK) acrescido de 5% sangue desfibrinado de carneiro e incubado em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK). Caso apresentasse crescimento microbiano a amostra do paciente seria excluída do estudo.

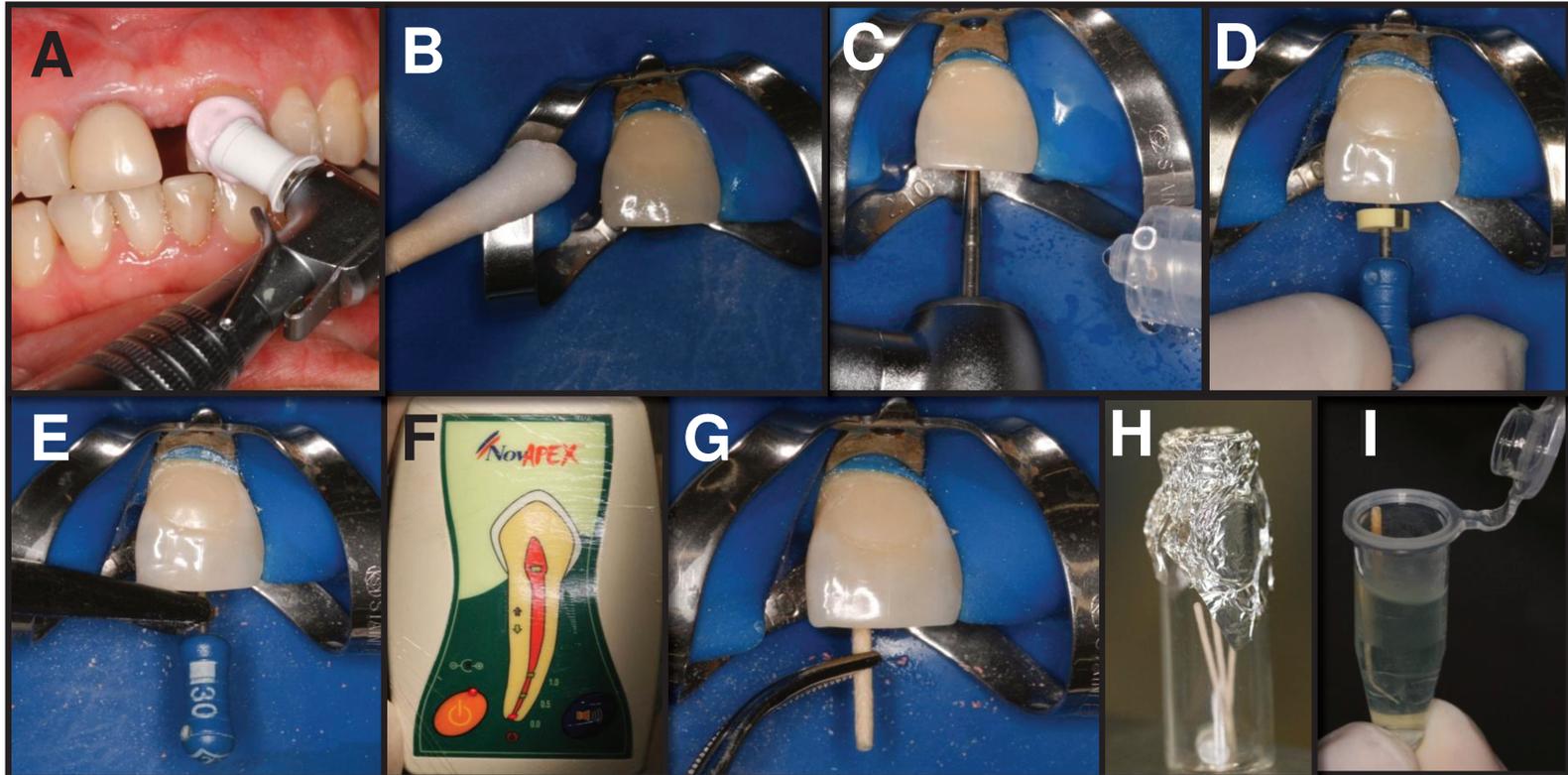


Figura 2. Coleta do canal radicular: **A** – Profilaxia, **B** – Descontaminação do campo operatório, **C** – Abertura coronária, **D** – Remoção do material obturador do canal radicular, **E** – Determinação do comprimento de trabalho, **F** – Localizador apical para realização da odontometria eletrônica, **G** – Coleta inicial, **H** – Frasco de vidro (coleta de endotoxinas), **I** – VMGA III (coleta microbiológica).

4.5 Procedimentos clínicos: abertura coronária, preparo químico-mecânico (PQM), medicação intracanal (MIC) e obturação dos canais radiculares

4.5.1 Primeira sessão de atendimento

A abertura coronária (**Figura 2**) foi realizada em alta rotação com sistema de irrigação do equipo fechado. Dessa forma para reduzir o aquecimento na ponta esférica diamantada estéril e apirogênica (#1012 ou #1014), a irrigação passou a ser realizada com soro fisiológico estéril e apirogênico. Ao se obter a forma de contorno e conveniência da abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram descontaminados novamente, com as mesmas soluções, e neutralizados, como descrito anteriormente.

Finalizada a abertura coronária, seguiu-se para o uso das brocas de Largo #2, Gates-Glidden #5, #4, #3 e #2, respectivamente, e limas manuais tipo K e H (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) com objetivo de remoção do material obturador (**Figura 2**) sem o uso de solventes e o pré-alargamento do terço cervical e médio. A guta-percha aderida às brocas de Largo e Gates-Glidden durante a desobturação do canal radicular foram coletados e depositados em tubos tipo *ependorf* contendo VMGA III. Quando uma lima K (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) ajustada no interior do canal radicular alcançava o comprimento aparente do dente determinado radiograficamente, fazia-se uso do localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-zion, Israel) para verificar a patência (desobstrução apical) e obter o comprimento de trabalho (CT). O CT foi estabelecido utilizando uma lima K ajustada em toda extensão do canal radicular, ou seja, equivalente ao “zero” sinalizado no localizador apical (**Figura 2**). Nesse momento foi determinado a lima anatômica inicial (LAI), que representa o calibre que melhor se ajusta no forame apical. Com auxílio do microscópio clínico (Opto Eletrônica S.A., São Carlos, SP) e

radiografia periapical verificou-se a ausência do material obturador no interior do canal radicular e realizou-se a coleta inicial **(C1)**.

A câmara pulpar foi descontaminada com 1,0 mL de CLX 2% gel (Endogel, Itapetininga, SP). O terço apical foi preparado através da técnica manual utilizando três limas de calibres acima da LAI em toda extensão do canal radicular e foi realizada a recapitulação com a LAI. A última lima utilizada foi determinada como lima anatômica final (LAF). Finalizada essa etapa, realizou o preparo escalonado (*step-back*) anatômico, com quatro limas crescentes à LAF e a cada troca de instrumento foi realizada a recapitulação.

Durante o preparo químico-mecânico (PQM), os canais foram totalmente preenchidos com CLX 2% gel a cada início do uso de lima e irrigados sequencialmente com 4,0 mL de soro fisiológico estéril. Após a instrumentação, foi confirmada a patência com a LAI e os canais foram irrigados com 4,0 mL de solução de *tween* 80 0,5% + lecitina de soja 0,07%, para neutralizar a ação da substância química auxiliar, seguido uma nova irrigação com 4,0 mL de solução fisiológica estéril. Posteriormente, 1,0 mL de EDTA 17% (ácido etilenodiaminotetracético) foi inserido no interior do canal radicular por 3 minutos sob agitação com uma lima manual estéril e apirogênica tipo K #15. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril. Após o PQM, foi realizada a segunda coleta **(C2)** respeitando os mesmos princípios de coleta (endotoxina e microbiológico) e processamento da amostra C1. Fez-se o preenchimento com 4,0 mL de soro fisiológico estéril no interior do canal radicular e o dente foi selado com uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na embocadura do canal, aplicado ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) no selamento coronário.

4.5.2 Segunda sessão de atendimento

As técnicas de coleta microbiológica e de endotoxinas, foram realizadas conforme descritas anteriormente.

Após cinco dias o paciente retornou e foi realizada a terceira coleta (**C3**), previamente à reinstrumentação do canal radicular. A reinstrumentação foi realizada utilizando a LAF e duas limas consecutivas de calibre superior. A CLX 2% gel foi empregada como substância química auxiliar e foi irrigado com soro fisiológico estéril e apirogênico. Efetuou-se a neutralização da substância química auxiliar com 4,0 mL de solução de *tween* 80 0,5% + lecitina de soja 0,07% seguido da irrigação com 4,0 mL de soro fisiológico estéril. Inseriu-se, 1,0 mL de EDTA 17% no interior do canal radicular por 3 minutos sob agitação com lima manual apirogênica tipo K #15. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril, e foi realizada a quarta coleta (**C4**). As coletas C3 e C4 têm como objetivo verificar o efeito do preparo mecânico do canal radicular associado ao uso das substâncias CLX 2% gel e EDTA 17% sobre microrganismos e endotoxinas. Após a coleta foi colocada uma medicação intracanal. Foram testadas três medicações intracanaís. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com a medicação intracanal utilizada:

- **Grupo 1** – Ca(OH)_2 + CLX 2% gel, no período de 14 dias: Os canais deste grupo foram secos com cones de papel absorvente, preenchidos com Ca(OH)_2 + CLX 2% gel com auxílio de lentulo #40 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça), e na sequência foi inserida uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), aplicado ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) no selamento coronário. Os pacientes selecionados foram: P1, P4, P7, P10 e P12.

- **Grupo 2** – Ca(OH)_2 + soro fisiológico estéril, no período de 14 dias: Os canais deste grupo foram secos com cones de papel absorvente, preenchidos com Ca(OH)_2 + soro fisiológico estéril com auxílio de lentulo #40 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça), e na sequência foi inserida uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), aplicado ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) no selamento coronário. Os pacientes selecionados foram: P2, P6, P8, P11 e P13.
- **Grupo 3** – CLX 2% gel, no período de 7 dias: Os canais deste grupo foram secos com cones de papel absorvente, preenchidos com CLX 2% gel com auxílio de uma seringa de 3 mL, e na sequência foi inserida uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), aplicado ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) no selamento coronário. Os pacientes selecionados foram: P3, P5, P9, P14 e P15.

Foram realizadas radiografias periapicais imediatamente após a colocação das medicações intracanaís contendo Ca(OH)_2 (grupo 1 e 2). As imagens radiográficas demonstraram que os canais radiculares estavam preenchidos de forma adequada.

4.5.3 Terceira sessão de atendimento

As técnicas de coleta microbiológica e de endotoxinas, foram realizadas conforme descritas anteriormente.

A medicação intracanal foi removida após 7 ou 14 dias. No grupo 1, utilizou-se 4,0 mL de solução de *tween* 80 0,5% + lecitina de soja 0,07% seguida da irrigação com 4,0 mL de soro fisiológico estéril associado à LAF mais dois instrumentos com calibre superior. No grupo 2 utilizou 8,0 mL de soro fisiológico estéril com auxílio da LAF mais duas limas. Enquanto que no grupo 3, utilizou-se 4,0 mL de solução de *tween* 80 0,5% + lecitina de soja 0,07% seguido da irrigação com 4,0 mL de soro fisiológico estéril. Em seguida, fez-se a quinta coleta (**C5**) de forma semelhante às anteriores. A coleta C5 tem como objetivo verificar o efeito da medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas. Aplicou-se 1,0 mL de EDTA 17% no interior do canal radicular, por 3 minutos sob agitação com lima manual estéril e apirogênica tipo K #15. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril.

Ao verificar ausência de sintomatologia dolorosa e exsudato, foi realizada a obturação do canal radicular. Empregou-se a técnica do cone modelado com CLX 2% gel. Foi realizada condensação lateral e compressão vertical utilizando condensadores de Paiva e termocompactador (Easy Endo, Belo Horizonte, MG), respectivamente. Na mesma sessão, o dente foi selado com uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na embocadura do canal. Aplicou-se ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) e o dente foi restaurado coronariamente com resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, MN, EUA) através da técnica incremental.

4.6 Processamento das amostras

4.6.1 Caracterização microbiana através da técnica de cultura microbiana

4.6.1.1 Inoculação, incubação e isolamento bacteriano

Os tubos tipo *Eppendorf* contendo as amostras foram imediatamente transferidos ao Laboratório de Microbiologia Endodôntica para o processamento microbiológico. No interior da câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) (**Figura 3**) os tubos foram agitados utilizando o vortex (MA 162 – Marconi, São Paulo, SP) por 60 segundos para facilitar a dispersão dos microorganismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000 utilizando o meio de cultura *Fastidious Anaerobe Broth* (FAB, Lab M, Bury, UK).

O presente estudo utilizou meios de cultura na forma de pó desidratado e suplementos seletivos pré-fabricados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante.

Foram inoculados 50 µL da amostra armazenada em VMGAIII, sem diluição (“mãe”) e das diluições 1/100 e 1/10.000 em placas pré-reduzidas contendo o meio de cultura *Fastidious Anaerobe Ágar* (FAA, Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro + 600 µL de Menadiona 1 mg/L (*Vitamin K3; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone* – SIGMA M5625) + 600 µL de Hemina 1 mg/L (*Hemin Bovine Minimum 80%* – SIGMA H5533) (**APÊNDICE III**), as quais foram incubadas na 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 anaeróbios estritos de crescimento lento.

Foram inoculados 50 µL da amostra original (“mãe”) em uma placa contendo o meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro (**APÊNDICE III**), a qual foi incubada aerobicamente em estufa bacteriológica (**Figura 3**) a 37°C por 2 dias, para permitir o crescimento de microrganismos aeróbios ou facultativos.

Alíquotas de 50 µL da amostra “mãe” foram inoculadas em placas de Petri contendo meios de cultura seletivos (**Figura 4**) (**APÊNDICE III**) e incubadas em diferentes períodos e condições gasosas, como descritas a seguir:

- Placas de Ágar m-Enterococcus (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) – incubadas em aerobiose a 37°C, por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de *Enterococcus* spp.
- Placas de Ágar Mitis Salivarius (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) – incubadas em aerobiose a 37°C, por 2 dias, seletivo para *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Enterococcus* spp.
- Placas de Ágar MacConkey (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) – incubadas em aerobiose a 37°C, por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de enterobactérias.
- Placas de Ágar Sabouraud Dextrose (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) – seletivo para detecção de espécies de leveduras, cujas placas foram incubadas por 4 dias à temperatura ambiente e depois incubadas em aerobiose a 37°C, por 2 dias.

4.6.1.2 Cultivo, isolamento, incubação e identificação dos microrganismos

Após a incubação, cada placa foi examinada em lupa estereoscópica (Lambda Let 2, Atto Instruments CO, Hong Kong) (**Figura 4**) em aumento de 3 vezes. As unidades formadoras de colônias foram contadas (UFC/mL) e os diferentes tipos de colônias foram diferenciadas e subcultivadas, com o objetivo de obtenção de culturas puras das espécies.

O número de UFCs foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas contendo o meio de cultura FAA analisadas. Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 2.000 ou 200.000 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. Quando não possibilitado a contagem na amostra inicial, foram utilizadas as diluições 10^{-2} ou 10^{-4} . Ou seja, quando a diluição 10^{-2} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 100 vezes menor que o inicial (1 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 2.000. Entretanto, quando a diluição 10^{-4} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 10.000 vezes menor que o inicial (1 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.

A diferenciação das colônias foi realizada de acordo com as suas características macroscópicas no ágar, o que é facilitado pela adição de sangue, observando-se: tamanho, cor, forma, textura, elevação, borda, superfície, consistência, opacidade e hemólise (nenhum, hemólise parcial ou hemólise completa) (**Figura 4**).

As colônias bacterianas foram isoladas em uma placa contendo BHI + 5% de sangue desfibrinado de carneiro e outra em FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro + hemina (1 mg/L) + vitamina K (1 mg/L), e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando-se uma placa na estufa bacteriológica e outra na câmara de anaerobiose, respectivamente; observando em qual condição gasosa houve crescimento bacteriano. As espécies que cresceram somente em incubação anaeróbica foram consideradas anaeróbias estritas, após verificar crescimento negativo em estufa bacteriológica e em cabine de CO₂ (Jouan, IG 150, Saint-Herblain, França). As espécies que cresceram nas três condições gasosas foram caracterizadas anaeróbias facultativas.

A morfologia bacteriana foi obtida a partir de colônias puras após cada incubação, através da coloração de Gram (**APÊNDICE IV**) (**Figura 3**), e testadas quanto à produção de catalase (**APÊNDICE V**) (**Figura 3**). O teste da oxidase (**APÊNDICE VI**) (**Figura 3**) também foi aplicado, para diferenciar bacilos Gram-negativos em fermentadores de glicose e não-fermentadores, sendo positivo para os últimos.

Foram utilizados testes bioquímicos padronizados (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) (**APÊNDICE VII**) (**Figura 3**) para especificação dos organismos isolados. Esses testes possuem reagentes que após a inoculação da suspensão bacteriana, evidenciam as exigências nutricionais e compostos específicos produzidos, pela mudança de cor, em determinados períodos. Os Kits fornecem gabaritos para finalizar a identificação, que pode ser verificada através o site: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>.

Os seguintes Kits padronizados são utilizados para a especificação primária dos microrganismos isolados:

- 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 (cocos Gram-positivos, catalase-positiva).
- API 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase-negativa).
- API 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para as enterobactérias (Bacilos entéricos Gram-negativos, catalase-positiva, oxidase-negativa).
- API NH (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp. (cocos e bacilos Gram-negativos e facultativos, oxidase-positiva).
- API C AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para identificar espécies de *Candida* spp.

Todos os tubos tipo *Eppendorf* contendo as amostras em VMGA III e cones de papel absorvente, imediatamente após a retirada das alíquotas para diluição e para o plaqueamento nos meios de cultura citados acima, foram estocados em freezer -20°C para análise através da técnica de PCR.



Figura 3. Identificação microbiana: A – Cultura (placa “mãe”), B – Câmara de anaerobiose, C – Estufa bacteriológica, D – Cultura pura, E – Teste da catalase, F – Morfologia de Gram, G – Teste bioquímico, H – Teste da oxidase, I – Coloração das fitas do teste da oxidase.

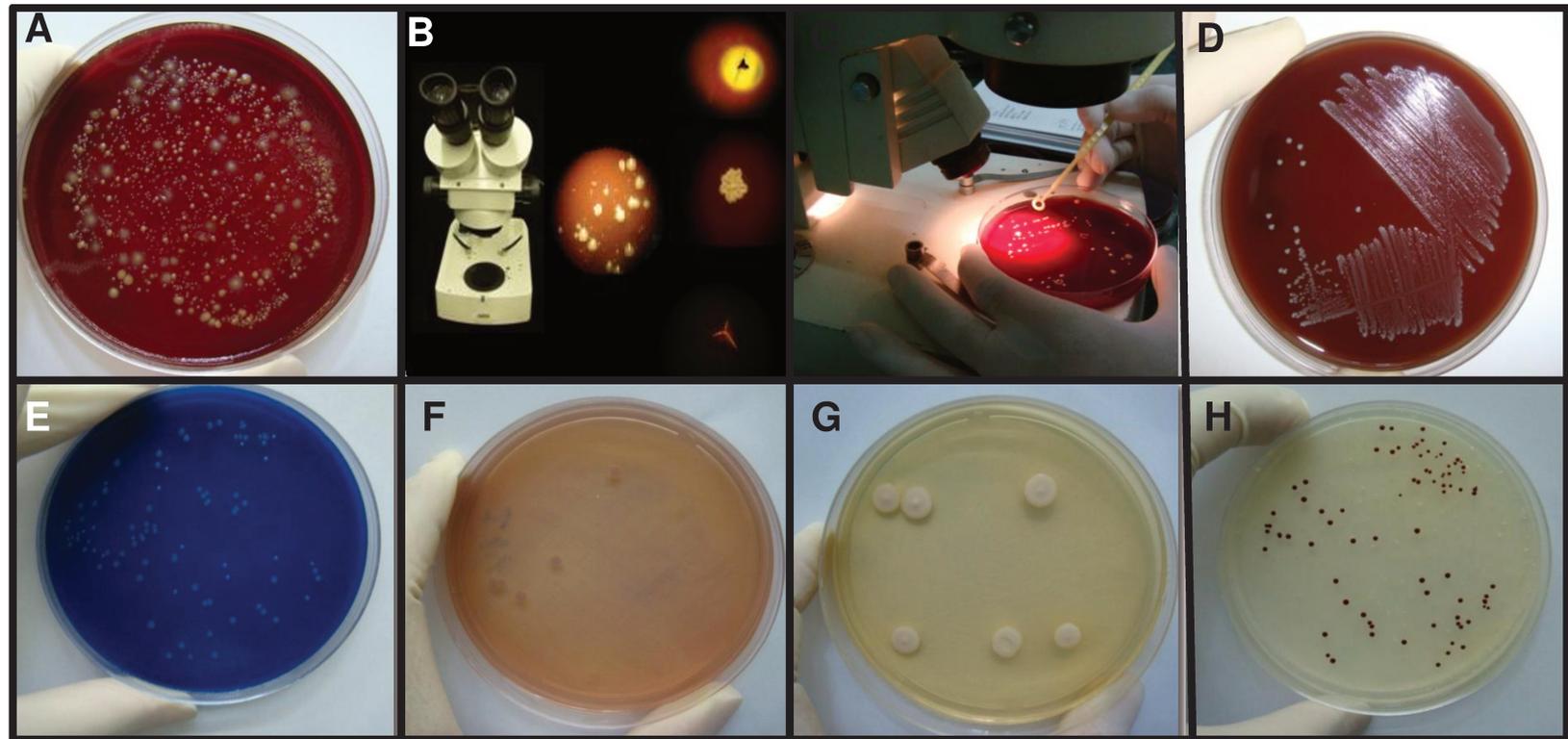


Figura 4. Isolamento microbiano: **A** – FAA amostra “mãe”, **B** – Lupa estereoscópica, **C** – Isolamento bacteriano, **D** – Cultura pura. **E-H: Meios seletivos:** **E** – Ágar Mitis Salivarius, **F** – Ágar MacConkey, **G** – Ágar Sabouraud Dextrose, **H** – Ágar m-Enterococcus.

4.6.2 Detecção microbiana através da técnica de PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi utilizada para detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae*, *Tanerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* nas amostras previamente coletadas. Foram empregados *primers* espécie-específicos, direcionados à região do gene 16S rRNA no DNA bacteriano. As sequências dos oligonucleotídeos foram obtidas a partir de referências na literatura.

4.6.2.1 Isolamento do DNA bacteriano

O isolamento de DNA foi realizada com o QIAamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (**APÊNDICE VIII**) (**Figura 5**).

4.6.2.2 Reação de PCR

Inicialmente foi realizado PCR com *primer universal* e depois com *primers* espécies-específicos.

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 µL da mistura de reagentes (*Master Mix*) (**Figura 5**) contendo as quantidades especificadas na **Tabela 1** para 1,5 µL do DNA isolado da amostra.

Tabela 1. Proporções dos reagentes no *Master Mix*

Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (10x <i>Reaction buffer</i> Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil)	2,5 µL
<i>dNTPs</i> (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil):	0,5 µL
<i>MgCl₂</i> (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil)	1,25 µL
<i>H₂O Milli-Q</i>	17,625 µL
<i>Primer Forward</i> 100µM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil)	0,75 µL
<i>Primer Reverse</i> 100µM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil)	0,75 µL
<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil)	0,125 µL

A *Taq DNA Polymerase* utilizada foi a *PlatinumTaq DNA Polymerase* (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), que inicia sua ação apenas na temperatura adequada, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (*mix*) da reação evitando a necessidade de pré-aquecimento.

Para determinar a temperatura de anelamento ideal, reações de PCR contendo *primers* espécie-específicos (**Tabela 2**) foram realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidos a vários gradientes de temperatura (MJ96G, Biocycler Termocicladores, Curitiba, PR, Brasil) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte.

Além das amostras foi utilizado como controle positivo o DNA genômico purificado dos microrganismos investigados e como controle negativo água *Milli-Q* esterilizada.

4.6.2.3 Eletroforese

As amostras após a reação de PCR (produtos da amplificação) foram analisadas quanto à presença de amplicons específicos para as sequências estudadas, através de eletroforese em gel de agarose (**Figura 5**). Foi utilizado gel de agarose a 1% (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) em tampão Tris-borato EDTA 10x diluído (pH 8,0) e corado com brometo de etídeo (5 µg/mL – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil).

Foi incluído em cada gel um marcador de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). As condições para a eletroforese foram 80 volts, durante 40 minutos. Após o término deste período, as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador sob luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) e a captura das imagens foram realizadas pelo programa LISCAP Image Capture software, fornecido pelo mesmo fabricante. Reações positivas foram determinadas através da presença de bandas que apresentavam o comprimento apropriado, de acordo com a **Tabela 2**. As etapas acima descritas encontram-se ilustradas na **Figura 5**.



Figura 5. Isolamento do DNA bacteriano. **A** – QIAamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA), **B** – Centrífuga, **C** – Amostras em banho d’água, **D** – Filtro contendo membrana de sílica para retenção do DNA, **E** – DNA isolado. **Preparo da reação da PCR.** **F, G, H** – Reagentes utilizados para o preparo do *mix* da PCR: água Milli-Q estéril, dNTPs, Cloreto de magnésio, *buffer*, Taq DNA *polymerase*, *primers*, **I** – Placa de 96 poços ou microtubos (**J**) com as amostras distribuídas para receber o *mix*, **L** – Termociclador. **Visualização do produto da PCR.** **M** – Inserção das amostras nos poços do gel de agarose, **N** – Fonte de eletroforese, **O** – Transiluminador de luz ultravioleta, **P** – Visualização das bandas em gel de agarose através da eletroforese utilizando *primer* universal.

Tabela 2. Espécies microbianas, *primers* com suas sequências, ciclos de temperatura e comprimento do fragmento amplificado para os nucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

Espécie	Sequência	Ciclos	Fragmento
<i>Universal</i>	F: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T R: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	Desnaturação inicial 95° por 10min e 40 ciclos: 95° por 10s, 60° por 10s e extensão final 72° por 25s	466 bp
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F: AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC R: ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	Desnaturação inicial 94° por 30s e 36 ciclos: 95° por 30s, 55° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	557 bp
<i>E. faecalis</i>	F: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G R: CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 95° por 1min, 57° por 1min, 72° por 1min e extensão final 72° por 7min	138 bp
<i>F. alocis</i>	F: CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG R: CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG	Desnaturação inicial 95° por 2min e 26 ciclos: 95° por 30s, 58° por 1min, 72° por 1min e extensão final 72° por 2min	594 bp
<i>F. nucleatum</i>	F: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G R: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	Desnaturação inicial 95° por 5min e 30 ciclos: 94° por 30s, 40° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	1000 bp
<i>G. morbillorum</i>	F: GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC R: TAT GAG GTT GGC TGA CTC TCG	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 52° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	781 bp
<i>P. micra</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 60° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	207 bp

Tabela 2. Espécies microbianas, *primers* com suas sequências, ciclos de temperatura e comprimento do fragmento amplificado para os nucleotídeos utilizados nas reações de PCR (continuação).

Espécie	Sequência	Ciclos	Fragmento
<i>P. endodontalis</i>	F: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC R: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 58° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	672 bp
<i>P. gingivalis</i>	F: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG R: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 60° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 2min	404 bp
<i>P. intermedia</i>	F: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG R : TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 58° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	575 bp
<i>P. nigrescens</i>	F: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG R: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 58° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	804 bp
<i>P. tanneriae</i>	F: CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG R: CAG CTG ACT TAT ACT CCC G	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 55° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	550 bp
<i>T. forsythia</i>	F: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA R: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	Desnaturação inicial 95° por 1min e 36 ciclos: 95° por 30s, 60° por 1min, 72° por 1min e extensão final 72° por 2min	641 bp
<i>T. denticola</i>	F: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T R: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 60° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	316 bp
<i>T. socranskii</i>	F: GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A R: TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 56° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	285 bp

4.6.3 Detecção e quantificação de endotoxina [Teste *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)]

O teste LAL Pyrogen-5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactérias Gram-negativas. Esse teste utiliza uma preparação de Lisado do Amebócito *Limulus* (LAL), em combinação com um incubador fotométrico e um software apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma aparência de turvação (densidade ótica). O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão (**Figura 6**).

Para realização do teste LAL Pyrogen-5000, todos os materiais que entrassem em contato com a amostra ou reagentes do teste estavam apirogênicos (livre de endotoxinas). Os materiais tornaram-se apirogênicos quando submetidos ao calor seco (estufa) a 250°C por um período de 30 minutos ou por energia ionizante (EMBRARAD, Cotia, SP). A radiação gama consiste na exposição dos produtos a ação de ondas eletromagnéticas curtas, geradas a partir de fontes seladas de Cobalto 60. Outros materiais já se apresentavam apirogênicos e esterilizados oriundos de fábrica (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

A quantificação de endotoxina foi realizada nas amostras coletadas dos mesmos 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical. Foram realizadas a coleta inicial (**C1**), após o PQM do canal radicular (**C2**), após 5 dias com canal preenchido com soro fisiológico estéril (**C3**), após a reinstrumentação (**C4**) e após a remoção da medicação intracanal (**C5**).

Para o cálculo da concentração de endotoxina em amostras desconhecidas, foi estabelecida uma curva-padrão (**Figura 6**) com quantidades conhecidas de endotoxina (*Escherichia coli*). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 0,01 EU/mL, 0,10 EU/mL, 1 EU/mL, 10 EU/mL, 100 EU/mL como descrito na **Tabela (3)** abaixo:

Tabela 3. Diluição da solução de endotoxina de *E. coli* para a determinação da curva padrão.

Tubos apirogênicos	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Volume de água reagente LAL	Volume de solução de endotoxina adicionado à água apirogênica
1	10	0,9 mL	0,1 mL de 100 EU/mL solução
2	1	0,9 mL	0,1 mL de 10 EU/mL solução
3	0,10	0,9 mL	0,1 mL de 1 EU/mL solução
4	0,01	0,9 mL	0,1 mL de 0,10 EU/mL solução

Os valores da absorvância das soluções de endotoxina previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 340 nm no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA) (**Figura 7**). A absorvância a 340 nm foi linear com os intervalos de concentração usados. A linearidade da curva padrão dentro do intervalo de concentração foi usada para determinar os valores de endotoxina. A reprodutibilidade pode ser verificada pela comparação das diferentes curvas.

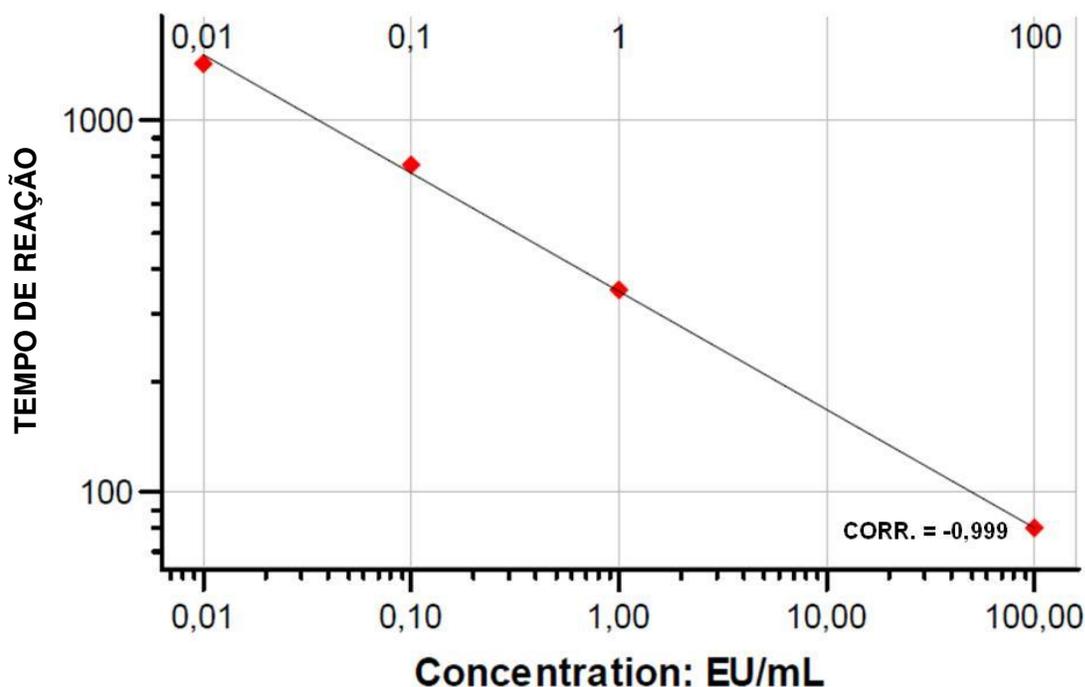


Figura 6. Curva padrão determinada a partir da diluição da solução de *E. coli* – utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxinas das amostras, com base na edotoxina da *E. coli* 055:B5 com concentração conhecida de 100 EU/mL.

4.6.3.1 Procedimentos para execução do teste

Foi impresso um esboço com o posicionamento da água apirogênica, da curva padrão, das amostras e do controle positivo do produto (PPC) na microplaca de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca (**Figura 7**): 100 µl das amostras e 100 µl dos controles positivos das mesmas, ambas em duplicata. Nas amostras controles foram dispensados 10 µl da endotoxina na concentração de 10 EU/mL, evitando a formação de bolha. Após o preenchimento das amostras e dos respectivos controles previamente contaminados com *E. coli*, foi dispensado

cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl de água apirogênica (branco), padrões de endotoxina (100 µl da concentração de 0,01 EU/mL; 0,1 EU/mL; 1 EU/mL; 10 EU/mL e 100 EU/mL). A placa foi pré-incubada por ≥ 10 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA). Próximo ao final do período de pré-incubação, cada frasco de reagente Pyrogent-5000 foi reconstituído com 5,2 mL de tampão de reconstituição Pyrogent-5000, que foi todo misturado levemente. Após isso, foi dispensado rapidamente 100 µL do reagente reconstituído de Pyrogent-5000 dentro de todos os poços da microplaca, iniciando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em sequência até a última coluna utilizada. Com a tampa da microplaca removida iniciou-se a leitura.

4.6.3.2 Cálculo da concentração de endotoxinas

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas foi monitorado na absorvância de 340 nm de cada poço da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente a 0,03 unidades. Este tempo é denominado tempo de reação. O software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA) (**Figura 7**) executa automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva padrão foram impressos no relatório. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim, prever as concentrações de endotoxina das amostras de teste.



Figura 7. Teste LAL Pyrogen-5000: **A** – Tubos de ensaio apirogênicos para preparo da curva padrão, **B** – Endotoxina *E. coli* 055:B5, **C** – Reagente Pyrogen-5000 LAL, **D** – Tampão de reconstituição Pyrogen-5000 LAL, **E** – Água LAL reagente, **F** – Distribuição do reagente Pyrogen-5000 LAL reconstituído na microplaca de 96 poços, **G** – Leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA), **H** – Software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados na identificação dos microrganismos através do método de cultura, PCR e quantificação de endotoxinas foram introduzidos numa planilha de cálculo Excel e estatisticamente analisados usando SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

Foram testadas as possíveis correlações entre quantidade de endotoxina, quantidade de microrganismos, número de espécies dentro de cada coleta por meio do teste de Correlação de Pearson. Na coleta inicial (C1) foram testadas também possíveis correlações com o tamanho das lesões radiográficas.

Para avaliar o efeito do preparo químico-mecânico na redução da concentração de unidades formadoras de colônias, utilizou-se o teste de Friedman ($p < 0,05$).

Para avaliar o efeito do preparo químico-mecânico na redução dos níveis de endotoxinas, utilizou-se o teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e radiográficos

O gênero feminino (n=11) prevaleceu ao masculino (n=4). A idade média dos pacientes foi de 43,6 anos (variando entre 19-65 anos). Observou-se que em 7/15 pacientes o tempo decorrido do primeiro tratamento endodôntico foi de realizado há menos de 10 anos e em 8/15 há ≥ 10 anos. As coletas foram realizadas em dentes unirradiculares: cinco incisivos centrais superiores (5/15), seis incisivos laterais superiores (6/15), um canino superior (1/15), um canino inferior (1/15), um segundo pré-molar superior (1/15) e um segundo pré-molar inferior (1/15). Durante a anamnese 2/15 relataram dor prévia. **(Tabela 4)**.

Clinicamente foi observado 6/15 pacientes com dor à percussão, 7/15 pacientes com dor à palpação na região periapical e 6/15 pacientes não apresentavam qualquer tipo de sintomatologia no momento da coleta. Foi verificada restauração definitiva em 14/15 dentes, e havia apenas um (1/15) caso com prótese provisória suportado por núcleo de preenchimento com resina composta **(Tabela 4)**.

Através do exame radiográfico todos os casos apresentaram desadaptação na interface dente-restauração. Foi observada uma obturação classificada radiograficamente como satisfatória, ou seja, compactada, sem espaços vazios na massa obturadora, com limite da guta-percha ≤ 2 mm do ápice em 4/15 dentes, enquanto nos outros (11/15) foi observada uma obturação ruim, não compactada, com espaços vazios na massa obturadora e uma distância da guta-percha ao ápice maior que 2 mm. Em relação ao tamanho da lesão periapical foi observado em 9/15 dentes valores ≤ 5 mm e 6/15 dentes valores maiores que 5 mm **(Tabela 4)**.

Tabela 4. Características clínicas e radiográficas dos 15 pacientes submetidos ao retratamento endodôntico e uso da medicação intracanal que participaram do estudo.

	Idade	Gênero	Dente	Dor			Coroa	Qualidade da restauração	Qualidade da obturação do canal radicular	Tempo do tratamento endodôntico anterior (anos)	Lesão periapical (mm)	
				Percussão	Palpação	Prévia *					≤5	>5
P1	44	feminino	21	Presente	Presente	Presente	Restaurada	Ruim	Boa	2		X
P2	45	masculino	12	Ausente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	>30		X
P3	45	feminino	11	Ausente	Presente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	>10		X
P4	19	feminino	11	Presente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	6	X	
P5	43	feminino	15	Presente	Presente	Ausente	Restaurada	Ruim	Boa	3	X	
P6	44	masculino	45	Presente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Boa	>10		X
P7	65	masculino	23	Ausente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	2		X
P8	51	feminino	21	Ausente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	10	X	
P9	38	masculino	22	Ausente	Presente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	15		X
P10	51	feminino	11	Ausente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Boa	10	X	
P11	40	feminino	12	Presente	Presente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	6	X	
P12	32	feminino	22	Presente	Presente	Presente	Prótese provisória	Ruim	Ruim	20	X	
P13	41	feminino	12	Ausente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	2	X	
P14	53	feminino	22	Ausente	Presente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	20	X	
P15	43	feminino	43	Ausente	Ausente	Ausente	Restaurada	Ruim	Ruim	7	X	

*Dor relatada em algum período previamente ao início do retratamento endodôntico.

5.2 Caracterização microbiana através da técnica de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Todas as amostras coletadas do campo operatório apresentaram livres de microrganismos.

Foi encontrada uma diversidade microbiana nas diferentes coletas, antes e após preparo químico-mecânico (PQM) e após uso da medicação intracanal (MIC) nos quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical analisados. Essa diversidade foi representada por bactérias anaeróbias facultativas e estritas, Gram-positivas e -negativas, cocos e bacilos; e fungos.

5.2.1 Requerimento gasoso dos microrganismos isolados nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Foram isoladas bactérias anaeróbias facultativas em todos os canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC. Houve maior frequência de bactérias facultativas nas cinco coletas realizadas. Foi encontrado 56/68 (82%) bactérias anaeróbias facultativas em C1, 10/14 (71%) em C2, 32/40 (80%) em C3, 9/13 (69%) em C4 e 16/20 (80%) em C5 (**Figura 8**).

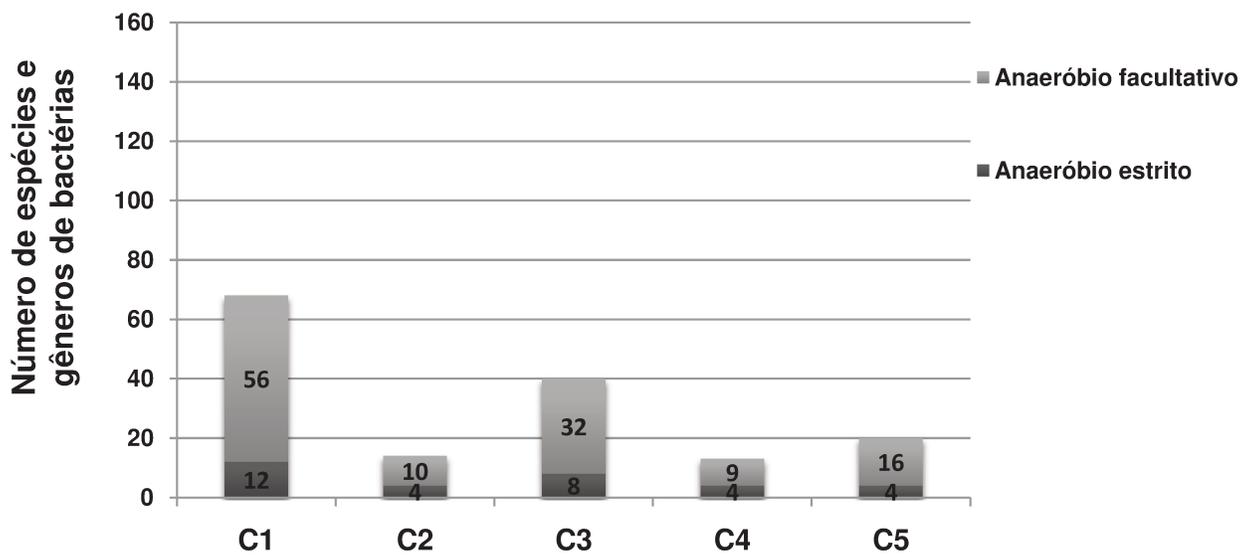


Figura 8. Número de espécies e gêneros de bactérias isoladas pelo método de cultura nas cinco coletas em relação ao requerimento gasoso, antes e após PQM e após uso da MIC.

5.2.2 Coloração de Gram dos microrganismos isolados nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Independente do momento da coleta houve maior frequência de bactérias Gram-positivas (115/155, 74%), quando comparado às bactérias Gram-negativas (40/155, 26%) nos 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical. Bactérias Gram-positivas corresponderam à 54/68 (79%) em C1; 8/14 (57%) em C2; 26/40 (65%) em C3; 12/13 (92%) em C4 e 15/20 (75%) em C5 (**Figura 9**).

Em relação às características morfológicas (**Tabela 8**) foi verificado nas coletas microbiológicas maior frequência de cocos Gram-positivos 34/68 (50%) em C1, 5/14 (36%) em C2, 18/40 (45%) em C3, 6/13 (46%) em C4 e 8/20 (40%) em C5.

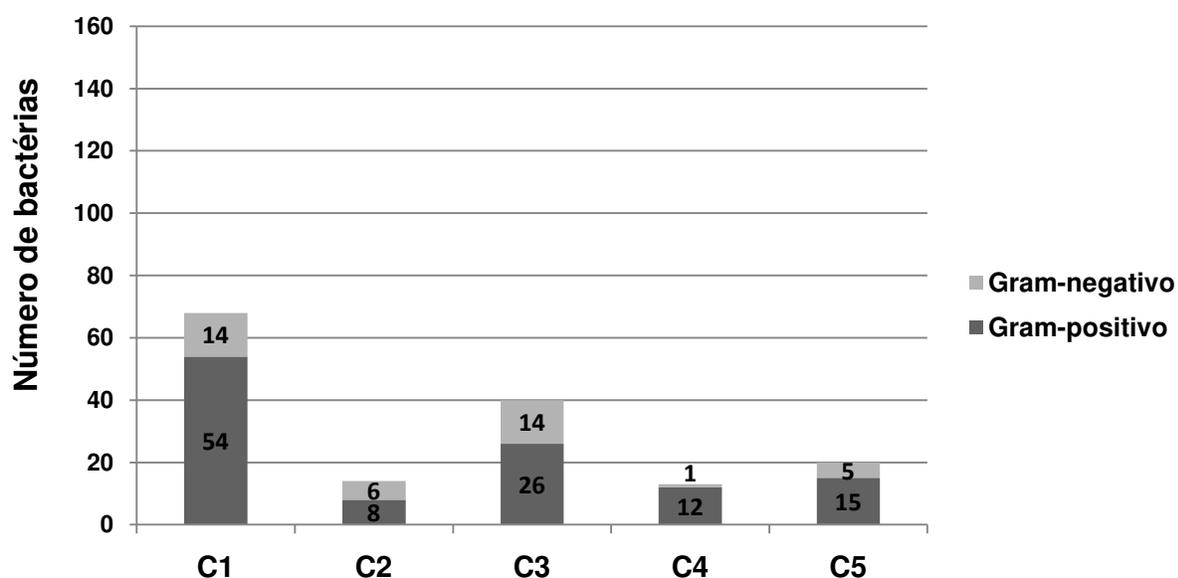


Figura 9. Número de bactérias isoladas pelo método de cultura microbiana nas cinco coletas em relação ao Gram, antes e após PQM e após uso da MIC.

5.2.3 Identificação e quantificação de espécies e gêneros de microrganismos nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Foi isolado um total de 158 microrganismos ao final das 5 coletas realizadas, deste 155 eram bactérias e 3 fungos. O fungo (*Candida albicans*) foi detectado em três casos (P6, P10 e P14) das coletas iniciais (C1). As bactérias cultiváveis pertenciam a 41 espécies e 24 gêneros, sendo que 7 microrganismos tiveram a identificação apenas pelo gênero. Em 2 casos, na quarta coleta em P7 e na terceira coleta em P9, não foi possível sua identificação. No geral, independente do momento da coleta, os microrganismos mais frequentemente isolados nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão

periapical foram *Neisseria* spp. (14/155), *Gemella morbillorum* (13/155), *Haemophilus aphrophilus* (10/155), *Enterococcus faecalis* (7/155), *Actinomyces naeslundii* (7/155) e *Bifidobacterium* spp. (7/155). Os gêneros mais frequentemente encontrados nos canais radiculares de dentes com insucesso e lesão periapical foram *Actinomyces* spp. (22/155); *Gemella* spp. (18/155); *Streptococcus* spp. (17/155); *Staphylococcus* spp. (16/155); *Neisseria* spp. (15/155); *Haemophilus* spp. (13/155) e *Enterococcus* spp. (8/155) (**Tabela 5**).

Na coleta inicial (C1) foram isolados 68 bactérias e 3 fungos. As bactérias cultiváveis pertenciam a 26 espécies e 15 gêneros, sendo que 5 microrganismos tiveram a identificação apenas pelo gênero. Foi detectada uma média de 4,5 espécies por casos positivos (1 a 9). Houve prevalência das espécies *Gemella morbillorum* (7/68), *Haemophilus aphrophilus* (6/68), *Enterococcus faecalis* (3/68), *Gemella haemolysans* (3/68), *Staphylococcus lentus* (3/68), *S. xylosum* (3/68), *Actinomyces israelii* (3/68), *A. naeslundii* (3/68) e *Candida albicans* (3/3). Os gêneros mais comumente isolados foram *Staphylococcus* spp. (11/68), *Gemella* spp. (10/68), *Actinomyces* spp. (9/68), *Neisseria* spp. (6/68), *Haemophilus* spp. (6/68) e *Streptococcus* spp. (5/68) (**Tabela 5**).

Após PQM (C2) foram isoladas 14 bactérias, pertencentes a 7 espécies e 10 gêneros, sendo que 3 microrganismos tiveram identificação apenas pelo gênero. Foi detectada uma média de 1,4 espécies por casos positivos (1 a 4). As espécies *Haemophilus aphrophilus* (3/14), *Eggerthella lenta* (2/14) e o gênero *Neisseria* spp. (2/14) se repetiram nos casos analisados (**Tabela 5**).

Após cinco dias, os canais radiculares preenchidos com soro fisiológico estéril e aprotínico apresentaram 40 bactérias, pertencentes a 21 espécies e 15 gêneros, sendo que 3 microrganismos tiveram identificação apenas pelo gênero. Foi detectada uma média de 2,8 espécies por casos positivos (1 a 11). Houve prevalência das espécies *Gemella morbillorum* (4/40), *Streptococcus mitis* (3/40),

S. oralis (3/40), *Enterococcus faecalis* (2/40), *Actinomyces viscosus* (2/40) e *Haemophilus parainfluenzae* (2/40). Os gêneros mais comumente isolados foram *Streptococcus* spp. (8/40), *Neisseria* spp. (6/40), *Actinomyces* spp. (5/40) e *Gemella* spp. (5/40) (**Tabela 5**).

Após a reinstrumentação foram isoladas 13 bactérias, pertencentes a 9 espécies e 9 gêneros, sendo que 2 microrganismos tiveram identificação apenas pelo gênero. Foi detectada uma média de 1,3 espécies por casos positivos (1 a 4). Houve prevalência das espécies *Enterococcus faecalis* (2/13), *Actinomyces viscosus* (2/14) e *Actinomyces naeslundii* (2/13). Os gêneros mais comumente isolados foram *Actinomyces* spp. (3/13), *Enterococcus* spp. (2/13) e *Streptococcus* spp. (2/13) (**Tabela 5**).

Após remoção da medicação intracanal foram isoladas 20 bactérias, pertencentes a 15 espécies e 13 gêneros, sendo que 3 microrganismos tiveram identificação apenas pelo gênero. Foi detectada uma média de 1,8 espécies por casos positivos (1 a 3). Houve prevalência das espécies *Aerococcus viridans* (2/20) e *Actinomyces viscosus* (2/20). Os gêneros mais comumente isolados foram *Actinomyces* spp. (5/20) e *Staphylococcus* spp. (3/20) (**Tabela 5**).

A **Tabela 6** mostra na coleta inicial uma maior diversidade de microrganismos. Após PQM (C2) houve redução do número de espécies de microrganismos na maioria dos casos e apenas em um caso (P8) o número de espécie permaneceu o mesmo. Após 5 dias com o canal preenchido com soro fisiológico (C3) a quantidade de espécies aumentou em dez casos (P3, P4, P5, P7, P10, P11, P12, P13, P14 e P15). Também foi encontrado após a reinstrumentação (C4) do canal radicular uma redução microbiana na maior parte dos casos analisados. Entretanto, após o uso da medicação intracanal (C5) foi verificado em seis amostras (P2, P4, P5, P6, P8 e P12) o aumento do número de espécies, quando comparado com a coleta anterior.

Tabela 5. Microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC expressos de acordo com as características morfológicas.

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5
Cocos Gram-negativos					
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1				
<i>Neisseria cinerea</i>	1				
<i>Neisseria</i> spp.	5	2	6		1
<i>Veillonella</i> spp.	1				
Cocos Gram-positivos					
<i>Aerococcus viridans</i>	2	1			2
<i>Enterococcus faecalis</i>	3		2	2	
<i>Enterococcus faecium</i>			1		
<i>Gemella haemolysans</i>	3		1	1	
<i>Gemella morbillorum</i>	7	1	4		1
<i>Globicatella sanguinis</i>				1	
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>					1
<i>Micrococcus</i> spp.	3	1			
<i>Parvimonas micra</i>			1		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1				1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1			
<i>Staphylococcus hominis</i>	1				

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

Tabela 5. Microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC expressos de acordo com as características morfológicas (continuação).

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5
Cocos Gram-positivos					
<i>Staphylococcus lentus</i>	3				1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3		1		1
<i>Streptococcus constellatus</i>	2				
<i>Streptococcus mitis</i>		1	3	1	1
<i>Streptococcus mutans</i>	1				
<i>Streptococcus oralis</i>	1		3	1	
<i>Streptococcus salivaris</i>			1		
<i>Streptococcus sanguis</i>	1		1		
Bacilos Gram-positivos					
<i>Actinomyces israelii</i>	3				1
<i>Actinomyces meyeri</i>			1		1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3		1	2	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2		1		
<i>Actinomyces viscosus</i>	1		2	1	2
<i>Bifidobacterium</i> spp.	3		2	1	1
<i>Clostridium acetobutylicum</i>				1	
<i>Clostridium bifermentans</i>	2				

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

Tabela 5. Microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC expressos de acordo com as características morfológicas (continuação).

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5
Bacilos Gram-positivos					
<i>Clostridium clostridiforme</i>	1				
<i>Clostridium sporogenes</i>	1				
<i>Clostridium</i> spp.	1				
<i>Eggerthella lenta</i>	1	2			
<i>Propionibacterium propionicus</i>	2	1	1	1	1
Bacilos Gram-negativos					
<i>Bacteroides fragilis</i>			1		
<i>Bacteroides ureolyticus</i>					1
<i>Capnocytophaga</i> spp.		1	1	1	
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	6	3			1
<i>Haemophilus influenzae</i>			1		
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>			2		
<i>Histophilus somni</i>			1		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			1		
<i>Prevotella oralis</i>			1		1
<i>Shigella</i> spp.					1
Fungos					
<i>Candida albicans</i>	3				

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

5.2.4 Unidades formadoras de colônias (UFCs) nas diferentes coletas

Houve crescimento microbiano em todas as amostras iniciais coletadas (C1), variando entre 1 UFC/mL a $1,7 \times 10^5$ UFC/mL (mediana: $2,57 \times 10^2$). Após o preparo químico-mecânico (C2) foi observada ausência de crescimento microbiano em cinco casos (33,3%), entretanto nos outros casos foi encontrado máximo de $2,69 \times 10^2$ UFC/mL (mediana: 1 UFC/mL) (**Tabela 7**).

Na segunda sessão, onde ocorreram a terceira (C3) e quarta coleta (C4), os valores da mediana foram de 57 UFC/mL (1 UFC/mL a $2,28 \times 10^2$) e 24 UFC/mL (0 a $1,31 \times 10^2$ UFC/mL), respectivamente. Em C3 e C4 bactérias cultiváveis foram isoladas em 100% e 73,3% dos casos, respectivamente (**Tabela 7**).

Na última coleta (C5) foi obtida uma mediana de 2 UFC/mL (0 a $5,07 \times 10^2$), correspondendo a um crescimento bacteriano de 73,3% das amostras (**Tabela 7**).

Após PQM, na primeira (C2) e segunda (C4) sessão, foi observada uma redução microbiana significativa (Friedman, $p < 0,05$) quando comparado C1 e C2 (99,93%) e C3 e C4 (80%). Finalizado o PQM da sessão inicial e após 5 dias com soro fisiológico estéril e aprotinase no interior do canal radicular houve aumento de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em 13 casos; já entre C4 e C5 houve aumento de UFCs em 6 casos. Ao comparar a coleta inicial (C1) e após a remoção da medicação intracanal (C5) foi verificada redução microbiana de 99,58% ($p < 0,05$).

5.2.5 Isolamento simultâneo dos microrganismos encontrados em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, de coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Baseado na **Tabela 6** verifica-se prevalência de microrganismos na coleta inicial (C1), mostrando uma redução nas etapas subseqüentes. Microrganismos como *Actinomyces* spp., *Aerococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eggerthella* spp., *Enterococcus* spp., *Gemella* spp., *Haemophilus* spp., *Micrococcus* spp., *Neisseria* spp., *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. aparecem nas diversas fases da coleta. Somente em um caso (P10) não houve repetição de microrganismos nos diferentes momentos da coleta. Na maioria dos casos (exceto P1 e P3) foram encontradas espécies bacterianas em C2, C3, C4 e C5 que não foram isoladas na coleta inicial. P5 foi o único caso onde foram isoladas mais bactérias na coleta C3, quando comparado com a coleta inicial.

Tabela 6. Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.

	C1	C2	C3	C4	C5
P1 G1	<i>Clostridium</i> spp. <i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium clostridiforme</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Neisseria cinerea</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp.	Ausência de microrganismos	Ausência de microrganismos
P2 G2	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Staphylococcus chromogenes</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Veillonella</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus</i> spp.	<i>Neisseria</i> spp. <i>Streptococcus oralis</i>	Ausência de microrganismos	<i>Actinomyces meyeri</i> <i>Neisseria</i> spp.
P3 G3	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Gemella haemolysans</i> <i>Eggerthella lenta</i> <i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>Neisseria</i> spp. <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Streptococcus oralis</i>	<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Streptococcus oralis</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
P4 G1	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Gemella haemolysans</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Neisseria</i> spp.	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Prevotella oralis</i>

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

G1: MIC Ca(OH)₂ + CLX 2% gel. G2: MIC Ca(OH)₂ + soro fisiológico estéril. G3: MIC CLX 2% gel.

Tabela 6. Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical (continuação).

	C1	C2	C3	C4	C5
P5 G3	<i>Aerococcus viridans</i>	Ausência de microrganismos	<i>Actinomyces viscosus</i> <i>Actinomyces meyeri</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Capnocytophaga</i> spp. <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria</i> spp. <i>Propionibacterium propionicus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus salivaris</i>	<i>Propionibacterium propionicus</i>	<i>Shigella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>
P6 G2	<i>Candida albicans</i> <i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Neisseria</i> spp.	<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Bacteroides ureolyticus</i> <i>Staphylococcus lentus</i>
P7 G1	<i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Gemella morbillorum</i> <i>Propionibacterium propionicus</i> <i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus mitis</i>	Não identificado	<i>Streptococcus mitis</i>
P8 G2	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Capnocytophaga</i> spp. <i>Gemella morbillorum</i> <i>Eggerthella lenta</i> <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Histophilus somni</i> <i>Neisseria</i> spp.	Ausência de microrganismos	<i>Haemophilus aphrophilus</i>
P9 G3	<i>Neisseria</i> spp. <i>Aerococcus viridans</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	Não identificado	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Gemella haemolysans</i>	<i>Aerococcus viridans</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Lactococcus lactis cremoris</i>

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

G1: MIC Ca(OH)₂ + CLX 2% gel. G2: MIC Ca(OH)₂ + soro fisiológico estéril. G3: MIC CLX 2% gel.

Tabela 6. Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de cultura nas coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical (continuação).

	C1	C2	C3	C4	C5
P10 G1	<i>Candida albicans</i> <i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>Staphylococcus lentus</i>	Ausência de microrganismos	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Gemella morbillorum</i>	<i>Globicatella sanguinis</i>	Ausência de microrganismos
P11 G2	<i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Gemella morbillorum</i> <i>Propionibacterium propionicus</i> <i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Propionibacterium propionicus</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Gemella morbillorum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella oralis</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Propionibacterium propionicus</i>
P12 G1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Aerococcus viridans</i>
P13 G2	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Gemella morbillorum</i> <i>Micrococcus</i> spp.	Ausência de microrganismos	<i>Actinomyces viscosus</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Streptococcus sanguis</i>	Ausência de microrganismos	Ausência de microrganismos
P14 G3	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Candida albicans</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>Staphylococcus lentus</i>	Ausência de microrganismos	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>
P15 G3	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Gemella haemolysans</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Ausência de microrganismos	<i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Gemella haemolysans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ausência de microrganismos

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

G1: MIC Ca(OH)₂ + CLX 2% gel. G2: MIC Ca(OH)₂ + soro fisiológico estéril. G3: MIC CLX 2% gel.

Tabela 7 – Porcentagens e números de bactérias isoladas pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical em relação à diversidade de espécies, características morfológicas e requerimento gasoso.

	C1	C2	C3	C4	C5
Número total de casos	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)
Casos positivos	15 (100%)	10 (66,7%)	15 (100%)	11 (73,3%)	11 (73,3%)
Casos negativos	0	5 (33,3%)	0	4 (26,7%)	4 (26,7%)
Diversidade de espécies por casos positivos					
Média (± dp)	4,5 ± 2,42	1,4 ± 0,97	2,86 ± 2,48	1,3 ± 0,95	1,82 ± 0,87
Mediana	4	1	2	1	2
Range	(1 – 9)	(1 – 4)	(1 – 11)	(1 – 4)	(1 – 3)
Mediana de UFC/mL	2,57 x 10 ²	1	57	24	2
Range	(1 – 1,7 x 10 ⁵)	(0 – 2,69 x 10 ²)	(1 – 2,28 x 10 ²)	(0 – 1,31 x 10 ²)	(0 – 5,07 x 10 ²)
Número total de bactérias	68 (100%)	14 (100%)	40 (100%)	13 (100%)	20 (100%)
Cocos Gram-positivos	34 (50%)	5 (36%)	18 (45%)	6 (46%)	8 (40%)
Bacilos Gram-positivos	20 (29%)	3 (21%)	8 (20%)	6 (46%)	7 (35%)
Cocos Gram-negativos	8 (12%)	2 (14%)	6 (15%)	0	1 (5%)
Bacilos Gram-negativos	6 (9%)	4 (29%)	8 (20%)	1 (8%)	4 (20%)
Bactérias Gram-positivas	54 (79%)	8 (57%)	26 (65%)	12 (92%)	15 (75%)
Bactérias Gram-negativas	14 (21%)	6 (43%)	14 (35%)	1 (8%)	5 (25%)
Bactérias anaeróbias estritas	12 (18%)	4 (29%)	8 (20%)	4 (31%)	4 (20%)
Bactérias anaeróbias facultativas	56 (82%)	10 (71%)	32 (80%)	9 (69%)	16 (80%)

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

A **Tabela 8** mostra as espécies de microrganismos isoladas e sua frequência, na coleta após a remoção da medicação intracanal (C5) de acordo com as três medicações intracanaís utilizadas [Ca(OH)₂ + CLX 2% gel; Ca(OH)₂ + soro fisiológico e CLX 2% gel]. No grupo da associação Ca(OH)₂ + CLX 2% gel foi encontrado *Actinomyces israelii*, *A. viscosus* e *Bifidobacterium* spp. (bacilos Gram-positivos), *Aerococcus viridans* e *Streptococcus mitis* (cocos Gram-positivos) e *Prevotella oralis* (bacilo Gram-negativo). No grupo do Ca(OH)₂ + soro fisiológico, foi encontrado *Actinomyces meyeri* e *Propionibacterium propionicus* (bacilos Gram-positivos) e *Bacteroides ureolyticus* e *Haemophilus aphrophilus* (bacilos Gram-negativos); e *Staphylococcus lentus* (coco Gram-positivo) e *Neisseria* spp. (coco Gram-negativo). No grupo da CLX 2% gel houve uma prevalência de *Aerococcus viridans*, *Gemella morbillorum*, *Lactococcus lactis cremoris* e *Staphylococcus xylosus* (cocos Gram-positivos), seguido de *Actinomyces naeslundii* e *A. viscosus* (bacilo Gram-positivo) e *Shigella* spp. (bacilo Gram-negativo).

Tabela 8. Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de cultura da coleta 5 (C5) divididos conforme a medicação intracanal utilizada.

Microrganismos	Ca(OH)₂ + CLX 2% gel	Ca(OH)₂ + soro	CLX 2% gel
Cocos Gram-negativos			
<i>Neisseria</i> spp.		1	
Cocos Gram-positivos			
<i>Aerococcus viridans</i>	1		1
<i>Gemella morbillorum</i>			1
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>			1
<i>Staphylococcus aureus</i>			1
<i>Staphylococcus lentus</i>		1	
<i>Staphylococcus xylosus</i>			1
<i>Streptococcus mitis</i>	1		
Bacilos Gram-negativos			
<i>Bacteroides ureolyticus</i>		1	
<i>Haemophilus aphrophilus</i>		1	
<i>Prevotella oralis</i>	1		
<i>Shiguella</i> spp.			1
Bacilos Gram-positivos			
<i>Actinomyces israelii</i>	1		
<i>Actinomyces meyeri</i>		1	
<i>Actinomyces naeslundii</i>			1
<i>Actinomyces viscosus</i>	1		1
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1		
<i>Propionibacterium propionicus</i>		1	
Total	6	6	8

Foi observada 60% de casos positivos (n=3) após a utilização da associação Ca(OH)_2 + CLX 2% gel por 14 dias, 80% de casos positivos (n=8) após associação Ca(OH)_2 + soro fisiológico estéril por 14 dias e 80% de casos positivos (n=4) no grupo da CLX 2% gel por 7 dias. O número de espécies encontradas por canal variou de 1 a 3 bactérias dependendo da medicação intracanal empregada. Houve predomínio de bactérias Gram-positivas em 83% para o grupo Ca(OH)_2 + CLX 2% gel, 50% para o grupo Ca(OH)_2 + soro fisiológico e 88% para o grupo CLX 2% gel. Bactérias anaeróbias facultativas prevaleceram em 67% no grupo Ca(OH)_2 + CLX 2% gel, 67% no grupo Ca(OH)_2 + soro fisiológico e 100% no grupo CLX 2% gel (**Tabela 9**).

Após o uso da medicação intracanal, o número de UFC na associação do Ca(OH)_2 + CLX 2% gel variou de 0 - 98 UFC/mL (mediana: 7 UFC/mL), no grupo Ca(OH)_2 + soro fisiológico foi de 0 – $5,07 \times 10^2$ UFC/mL (mediana: 2 UFC/mL) e no grupo da CLX 2% gel esteve entre 0 – 32 UFC/mL (mediana: 3 UFC/mL) (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Porcentagens e números de bactérias isoladas pelo método de cultura após o uso da MIC (C5) de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical em relação à diversidade de espécies, características morfológicas e requerimento gasoso.

	Ca(OH) ₂ + CLX 2% gel	Ca(OH) ₂ + soro	CLX
Número total de casos	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Casos positivos	3 (60%)	4 (80%)	4 (80%)
Casos negativos	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)
Diversidade de espécies por casos positivos			
Média (± dp)	2,00 ± 1,00	1,5 ± 0,58	2,00 ± 1,15
Mediana	2	1,5	2
Range	(1 – 3)	(1 – 2)	(1 – 3)
Mediana de UFC/mL	7	2	3
Range	(0 – 98)	(0 – 5,07 x 10 ²)	(0 – 32)
Número total de bactérias	6 (100%)	6 (100%)	8 (100%)
Cocos Gram-positivos	2 (33%)	1 (17%)	5 (63%)
Bacilos Gram-positivos	3 (50%)	2 (33%)	2 (25%)
Cocos Gram-negativos	0	1 (17%)	0
Bacilos Gram-negativos	1 (17%)	2 (33%)	1 (13%)
Bactérias Gram-positivas	5 (83%)	3 (50%)	7 (88%)
Bactérias Gram-negativas	1 (17%)	3 (50%)	1 (13%)
Bactérias anaeróbias estritas	2 (33%)	2 (33%)	0
Bactérias anaeróbias facultativas	4 (67%)	4 (67%)	8 (100%)

5.3 Detecção microbiana através da técnica de PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA de coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Todas as amostras coletadas do campo operatório apresentaram livres de DNA bacteriano quando foi empregado o *primer universal* direcionado ao gene 16S rRNA.

Todas as amostras (n=75), dos quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, independente da coleta (C1, C2, C3, C4 e C5) apresentaram DNA bacteriano quando foi empregado o *primer universal* direcionado ao gene 16S rRNA (**Figura 10**).

Todos os microrganismos investigados pelo método de PCR foram detectados em pelo menos um momento da coleta (C1, C2, C3, C4 ou C5). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae*, *Tanerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* não foram encontrados através da técnica de cultura microbiana, e foram detectados pelo método de PCR.

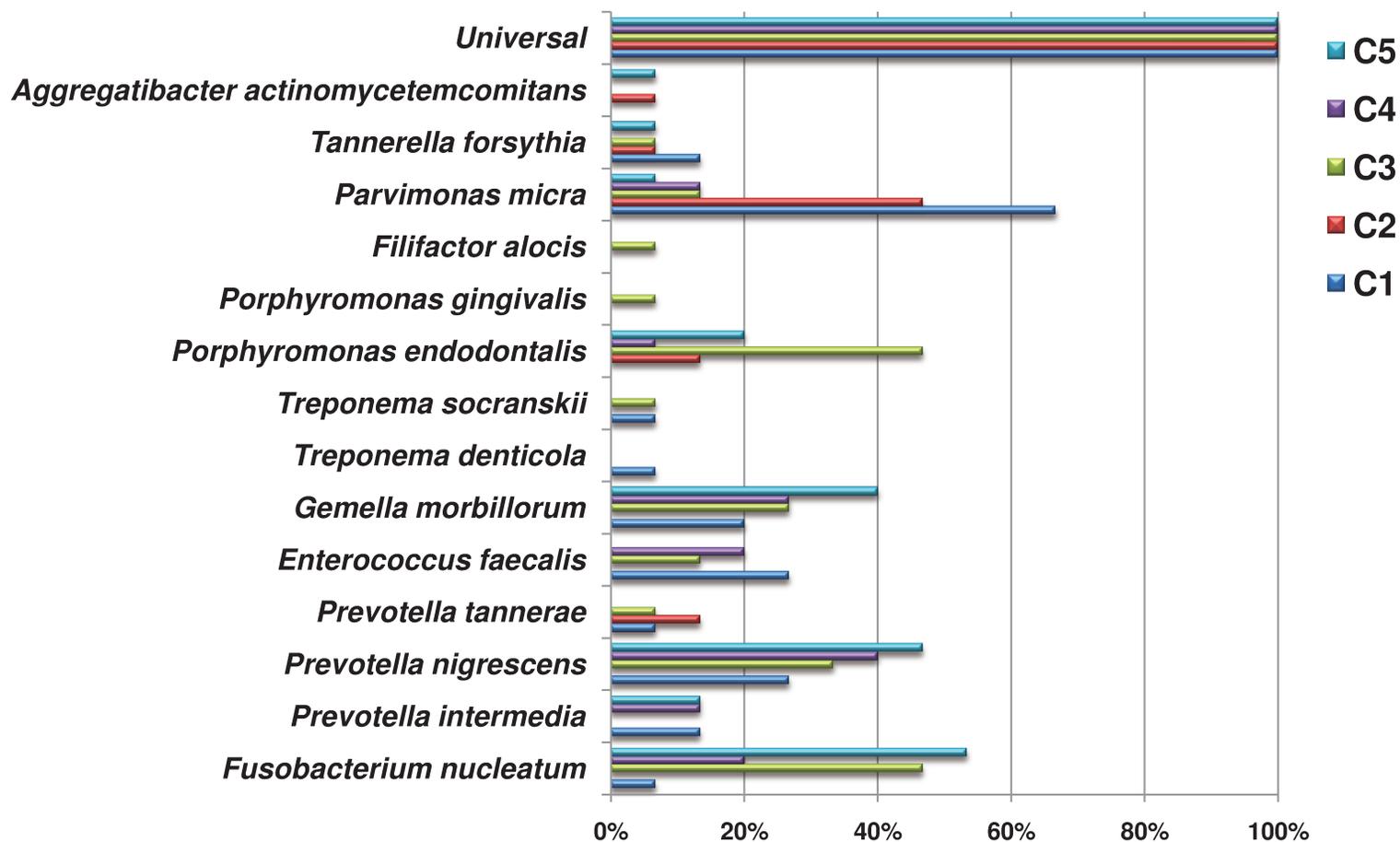


Figura 10. Porcentagem de microrganismos detectados relacionando cada espécie com o número de canais radiculares analisados (n=15), distribuídos nas diferentes coletas – C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

Foi encontrado um total de 124 microrganismos através do método de PCR, nos quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical investigados.

Os números de microrganismos encontrados nas diversas coletas foram 29 (C1), 13 (C2), 32 (C3), 21 (C4) e 29 (C5) (**Tabela 10**).

Na coleta inicial (C1) foram detectadas pelo método de PCR 10 espécies. As espécies mais frequentemente encontradas foram: *Parvimonas micra* (10/15); *Enterococcus faecalis* (4/15); *Prevotella nigrescens* (4/15); *Gemella morbillorum* (3/15), *Prevotella intermedia* (2/15) e *Tannerella forsythia* (2/15).

Após o preparo químico-mecânico (C2) foram encontradas cinco espécies: *Parvimonas micra* (7/15); *Prevotella tanneriae* (2/15); *Porphyromonas endodontalis* (2/15); *Tannerella forsythia* (1/15) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (1/15).

Na terceira coleta (C3) foram detectadas 11 espécies bacterianas, dessas predominaram *Porphyromonas endodontalis* (7/15); *Fusobacterium nucleatum* (7/15); *Prevotella nigrescens* (5/15) e *Gemella morbillorum* (4/15).

Em C4, das 7 espécies bacterianas detectadas, as mais frequentemente observadas foram *Prevotella nigrescens* (6/15); *Gemella morbillorum* (4/15); *Fusobacterium nucleatum* (3/15) e *Enterococcus faecalis* (3/15).

Independente do tipo da medicação intracanal utilizada, após sua remoção (C5) foram encontradas 8 espécies, as mais detectadas foram: *Fusobacterium nucleatum* (8/15); *Prevotella nigrescens* (7/15) e *Gemella morbillorum* (6/15).

Tabela 10. Microrganismos detectados através do método de PCR nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC, de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.

Microrganismos	C1	C2	C3	C4	C5	Total
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>		1			1	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	4		2	3		9
<i>Filifactor alocis</i>			1			1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1		7	3	8	19
<i>Gemella morbillorum</i>	3		4	4	6	17
<i>Parvimonas micra</i>	10	7	2	2	1	22
<i>Porphyromonas endodontalis</i>		2	7	1	3	13
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			1			1
<i>Prevotella intermedia</i>	2			2	2	6
<i>Prevotella nigrescens</i>	4		5	6	7	22
<i>Prevotella tanneriae</i>	1	2	1			4
<i>Tanerella forsythia</i>	2	1	1		1	5
<i>Treponema denticola</i>	1					1
<i>Treponema socranskii</i>	1		1			2
TOTAL	29	13	32	21	29	124

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

A **Tabela 11** apresenta as espécies bacterianas investigadas e detectadas pelo método de PCR, nos quinze canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis* não foram detectados na coleta inicial, e foram detectados em coletas posteriores.

Houve aumento na detecção de *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella nigrescens* e em relação a C1.

Filifactor alocis (C3), *Porphyromonas gingivalis* (C3) e *Treponema denticola* (C1) foram detectados em apenas 1 momento da coleta.

Tabela 11. Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de PCR nas coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.

	C1	C2	C3	C4	C5
P1 G1	Não detectado	Não detectado	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella tannerae</i>	Não detectado	Não detectado
P2 G2	Não detectado	Não detectado	<i>Prevotella nigrescens</i>	Não detectado	Não detectado
P3 G3	Não detectado	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Não detectado	Não detectado	Não detectado
P4 G1	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella tannerae</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>P. endodontalis</i> <i>Prevotella nigrescens</i>
P5 G3	Não detectado	Não detectado	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
P6 G2	Não detectado	<i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella tannerae</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella nigrescens</i>
P7 G1	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella nigrescens</i>
P8 G2	<i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Prevotella tannerae</i> <i>Treponema denticola</i>	Não detectado	Não detectado	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

G1: MIC Ca(OH)₂ + CLX 2% gel. G2: MIC Ca(OH)₂ + soro fisiológico estéril. G3: MIC CLX 2% gel.

Tabela 11. Distribuição dos microrganismos isolados pelo método de PCR nas coletas (C1, C2, C3, C4 e C5) antes e após PQM e após uso da MIC de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical (continuação).

	C1	C2	C3	C4	C5
P9 G3	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Tannerella forsythia</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Tannerella forsythia</i>
P10 G1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Tannerella forsythia</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Não detectado
P11 G2	<i>Treponema socranskii</i> <i>Parvimonas micra</i>	<i>Parvimonas micra</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>Parvimonas micra</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>P. endodontalis</i> <i>Prevotella nigrescens</i>
P12 G1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Parvimonas micra</i>	<i>Parvimonas micra</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>P. endodontalis</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	Não detectado	Não detectado
P13 G2	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Parvimonas micra</i>	Não detectado	Não detectado	<i>Prevotella nigrescens</i>	Não detectado
P14 G3	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Parvimonas micra</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Filifactor alocis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Treponema socranskii</i>	Não detectado	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella nigrescens</i>
P15 G3	<i>Parvimonas micra</i>	Não detectado	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Prevotella intermedia</i>

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias com soro fisiológico após a primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

G1: MIC Ca(OH)₂ + CLX 2% gel. G2: MIC Ca(OH)₂ + soro fisiológico estéril. G3: MIC CLX 2% gel.

Foram observados níveis de detecção microbiana diferentes após o uso da medicação intracanal; 7 microorganismos foram detectados em amostras do grupo da associação de Ca(OH)_2 + CLX 2% gel, 8 microorganismos quando Ca(OH)_2 + soro fisiológico estéril foi aplicado e 14 microorganismos quando os canais radiculares foram preenchidos com CLX 2% gel.

A ausência de microorganismos testados foi observada em 3 casos do grupo Ca(OH)_2 + CLX 2% gel; 2 do grupo do Ca(OH)_2 + soro fisiológico estéril e 1 do grupo da CLX 2% gel, embora todos apresentassem DNA microbiano, conforme detectado pelo *primer universal* direcionado ao gene 16S rRNA.

Não foi detectada correlação estatisticamente significativa entre a presença dos microorganismos testados por PCR e aspectos clínicos e radiográficos ($p > 0,05$), assim como associações entre espécies bacterianas.

5.4 Relação bactérias cultiváveis (UFC/mL) e níveis de endotoxinas (EU/mL) com aspectos clínicos e radiográficos de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical

As coletas realizadas nos casos sem sintomatologia provocada apresentaram mediana de $1,49 \times 10^2$ UFC/mL (6/15), enquanto que nos casos com sintomatologia aos testes de percussão e palpação esse valor foi maior, correspondendo a $4,17 \times 10^2$ UFC/mL (9/15) ($p > 0,05$).

Observa-se que a mediana de UFCs em dentes com dor à percussão foi de $3,2 \times 10^2$ UFC/mL e dor à palpação foi de $4,72 \times 10^2$ UFC/mL, enquanto que as ausências dessas sintomatologias representaram a $2,57 \times 10^2$ UFC/mL e $1,33 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente ($p > 0,05$) (**Tabela 12**).

Em relação aos níveis de endotoxinas não foi verificada correlação entre esses valores e os aspectos clínicos de dor à palpação e à percussão ($p > 0,05$).

Foi observada correlação positiva entre altos níveis de endotoxinas e lesão periapical maior que 5 mm ($p < 0,05$, r pearson = 0,041). Os dentes que apresentavam na região periapical lesão ≤ 5 mm tinham menor quantidade de endotoxinas (2,28 EU/mL) que aqueles com lesão > 5 mm (4,735 EU/mL). Entretanto não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação às UFCs e o tamanho da lesão periapical (**Tabela 12**).

Observa-se que as concentrações de endotoxina e UFC em dentes tratados por mais de 10 anos foram de $4,72 \times 10^2$ UFC/mL e 3,96 EU/mL, respectivamente. Enquanto que em dentes com menor tempo de tratamento endodôntico (< 10 anos) esses valores foram de $2,57 \times 10^2$ UFC/mL e 2,28 EU/mL ($p > 0,05$) (**Tabela 13**).

Os valores de UFCs e níveis de endotoxinas em dentes com tratamento endodôntico ruim foram de $4,17 \times 10^2$ UFC/mL e 4,29 EU/mL, respectivamente; enquanto que em dentes com tratamento endodôntico de boa qualidade esses valores corresponderam a 16,5 UFC/mL e 1,47 EU/mL ($p > 0,05$) (**Tabela 13**).

Os dentes que radiograficamente apresentaram distância da guta-percha ao ápice ≤ 2 mm observou-se valores de UFCs e endotoxina de 42 UFC/mL e 3,96 EU/mL, respectivamente. Quando essa distância apresentava maior que 2 mm do ápice esses valores corresponderam a $5,2 \times 10^3$ UFC/mL e 5,74 EU/mL ($p > 0,05$) (**Tabela 13**).

Tabela 12. Relação bactéria (UFC/mL) e endotoxina (EU/mL) de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, e aspectos clínicos e radiográficos.

	Amostra total	Dor à Percussão		Dor à Palpação		Radioluscência periapical	
	n=15	Presença	Ausência	Presença	Ausência	≤5 mm	>5 mm
Bactéria (UFC/mL)							
Mediana	2,57x10 ²	3,2x10 ²	2,57x10 ²	4,72x10 ²	1,33x10 ²	4,17x10 ²	1,37x10 ²
Range	(1 – 1,7x10 ⁵)	(1 – 1,54x10 ⁵)	(14 – 1,7x10 ⁵)	(1 – 1,6x10 ⁵)	(13 – 1,7x10 ⁵)	(1 – 1,7x10 ⁵)	(13 – 1,6x10 ⁵)
Endotoxina (EU/mL)							
Mediana	3,96	3,26	3,96	2,23	4,735	2,28*	4,735*
Range	(0,0823 – 15,3)	(0,729 – 15,3)	(0,0823 – 14,5)	(0,0823 – 15,3)	(0,447 – 14,5)	(0,0823 – 15,3)	(0,729 -14,5)

UFC, unidade formadora de colônia.

*Diferença estatística significativa (p<0.05)

Tabela 13. Relação bactéria (UFC/mL) e endotoxina (EU/mL) de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, e distância da guta percha ao ápice, tempo após o tratamento endodôntico e qualidade da obturação do canal radicular.

	Distância da guta-percha ao ápice		Tempo após o tratamento endodôntico		Qualidade da obturação	
	≤ 2 mm	> 2 mm	< 10 anos	≥ 10 anos	Boa	Ruim
Bactéria (UFC/mL)						
Mediana	42	5,2x10 ³	2,57x10 ²	4,72x10 ²	16,5	4,17x10 ²
Range	(1 – 1,7x10 ⁵)	(4,17x10 ² – 1,6x10 ⁵)	(1 – 1,7x10 ⁵)	(14 – 1,6x10 ⁵)	(1 – 1,54x10 ⁵)	(14 – 1,7x10 ⁵)
Endotoxina (EU/mL)						
Mediana	3,96	5,74	2,28	3,96	1,47	4,29
Range	(0,447 – 14,5)	(0,0823 – 15,3)	(0,729 – 15,3)	(0,0823 – 9,27)	(0,447 – 5,51)	(0,0823 – 15,3)

UFC, unidade formadora de colônia.

5.5 Detecção e quantificação de endotoxina [Teste *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) Pyrogent-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)] antes e após PQM e após uso da MIC

Em todas as amostras de C1 e C2 foram detectadas concentrações de endotoxinas, entretanto nas outras coletas (C3, C4 e C5) não foi possível sua quantificação.

Os resultados da coleta inicial (C1) obtidos através do método turbidimétrico (Pyrogent 5000 LAL), mostraram concentrações de endotoxinas entre 0,0823 EU/mL a 15,3 EU/mL (mediana – 3,96 EU/mL). Em relação à coleta após o preparo químico-mecânico (PQM) (C2) foram detectados valores entre <0,01EU/mL a 8,62 EU/mL (mediana – 1,34 EU/mL) (**Tabela 14**).

Após PQM, quando comparado C1 e C2 observou-se uma redução significativa dos níveis de endotoxinas ($p = 0,0017$). Essa redução correspondeu em porcentagem a 60,6 (Wilcoxon, $p < 0,05$).

Tabela 14. Concentração de endotoxina nas coletas realizadas antes e após PQM durante o retratamento endodôntico de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.

	C1	C2
P1	0,729	< 0,01
P2	3,96	1,34
P3	9,15	4,56
P4	1,68	0,265
P5	2,23	2,85
P6	5,51	1,92
P7	14,5	8,62
P8	9,27	3,68
P9	2,21	1,05
P10	0,447	0,432
P11	15,3	1,55
P12	4,29	1,69
P13	2,28	0,0424
P14	0,0823	0,0393
P15	8,04	0,663

C1 (primeira coleta): realizada após a remoção do material obturador; C2 (segunda coleta): após PQM; C3 (terceira coleta): antes da reinstrumentação (5 dias preenchido com soro fisiológico após primeira sessão); C4 (quarta coleta): após a reinstrumentação; C5 (quinta coleta): após a remoção da MIC.

6 DISCUSSÃO

6.1 Identificação de microrganismos pelo método de cultura nas coletas realizadas antes e após PQM e após o uso da MIC

O método de cultura microbiana foi empregado neste estudo com o objetivo de obter ampla caracterização da microbiota presente no interior dos canais radiculares de quinze dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical, nas coletas realizadas antes e após o preparo químico-mecânico (PQM) e após o uso da medicação intracanal (MIC). Esse método permite o crescimento de várias espécies de forma não seletiva (Siqueira & Rôças, 2005), e tem sido amplamente utilizado na identificação de microrganismos viáveis no interior do canal radicular após PQM na infecção endodôntica primária (Vianna *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2007a) e secundária (Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2001).

Todas as amostras (15/15) obtidas a partir da coleta inicial (C1) do presente estudo apresentaram crescimento de microrganismos viáveis, assim como no trabalho de Delboni (2009). Entretanto, observa-se na literatura alguns trabalhos utilizando método de cultura que não detectaram microrganismos viáveis em todas as amostras iniciais (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003b). Além dos meios de cultura (BHI e FAA), somente os estudos de Delboni (2009) e o presente trabalho utilizaram meios seletivos m-Enterococcus (*Enterococcus* spp.), Mitis Salivarius (*Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.), MacConkey (Enterobactérias) e Sabouraud Dextrose (Fungos) que favoreceram o isolamento de cepas viáveis, isso explica a detecção de microrganismos em todos os casos investigados.

Na coleta inicial (C1) verificou-se um maior número de UFCs e espécies de microrganismos por canal, quando comparada às outras coletas subsequentes (C2, C3, C4 e C5). O número de UFCs em dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical deste estudo foi de 1 a $1,7 \times 10^5$ UFC/mL, lembrando que esses valores poderiam ser superiores pois sabe-se que microrganismos são eliminados durante a desobturação do canal. Outros trabalhos como de Peciulienė *et al.* (2001) e Cheung & Ho (2001) mostraram valores semelhantes de 40 a 7×10^7 UFC/mL e 0 a $2,3 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Neste estudo, a coleta inicial apresentou uma maior média de número de espécies por canal (n=4,5) superior às detectadas em outros trabalhos, tais como 1,6 (Möller *et al.*, 1966), 1,7 (Molander *et al.*, 1998), 1,3 (Sundqvist *et al.*, 1998), 1,7 (Hancock *et al.*, 2001); 1,8 (Cheung & Ho, 2001). Essa maior obtenção de espécies por canal pode ser devido à coleta adicional da guta-percha infectada utilizando brocas de Gates-glidden no terço cervical e médio, limas manuais H e K em toda extensão do canal radicular, assim como a utilização de meios de cultura seletivos.

Na coleta inicial (C1) foram isolados 26 espécies bacterianas e uma espécie de fungo. Houve predomínio das espécies *Gemella morbillorum* (7/68), *Haemophilus aphrophilus* (6/68), *Enterococcus faecalis* (3/68), *Gemella haemolysans* (3/68), *Staphylococcus lentus* (3/68), *S. xylosus* (3/68), *Actinomyces israelii* (3/68), *A. naeslundii* (3/68) e *Candida albicans* (3/3). Os gêneros mais comumente isolados foram *Staphylococcus* spp. (11/68), *Gemella* spp. (10/68), *Actinomyces* spp. (9/68), *Neisseria* spp. (6/68), *Haemophilus* spp. (6/68) e *Streptococcus* spp. (5/68). Esses microrganismos isolados dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical corroboram com os achados da literatura (Möller, 1966; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; 2001; Cheung & Ho, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b e Delboni, 2009), mostrando que a composição da microbiota de um canal de um dente tratado endodonticamente é polimicrobiana e difere de infecções endodônticas primárias (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998;

Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b; Siqueira & Rôças, 2005). A infecção endodôntica primária é caracterizada pelo predomínio de bacilos anaeróbios estritos Gram-negativos (Baumgartner & Falkler, 1991; Sundqvist, 1992; Gomes *et al.*, 1994a; Vianna *et al.*, 2006). Na infecção endodôntica secundária como demonstrado através deste estudo há uma prevalência de bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas, concordando com os resultados previamente discutidos na literatura (Molander *et al.*, 1998; Peuciliene *et al.*, 2000; Cheung & Ho, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b; Gomes *et al.*, 2004). As características específicas na composição da microbiota podem estar condicionadas pela sua disponibilidade de nutrientes (ter Steeg & van der Hoeven, 1989; Gomes *et al.*, 1996) e o tempo de infecção (Fabricius *et al.*, 1982a). As diversas interações dos microrganismos viáveis produzem um ambiente favorável ao aumento do potencial patogênico da infecção (Fabricius *et al.*, 1982b), permitindo a expressão dos seus fatores de virulência (Ziebuhr *et al.*, 1999).

Enterococcus faecalis é uma espécie frequentemente detectada no canal radicular de dentes com infecção endodôntica secundária (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulene *et al.*, 2000; 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004c; Gomes *et al.*, 2008a) nos casos de insucesso endodôntico e presença de lesão periapical. Entretanto, Cheung & Ho (2001) não detectaram *E. faecalis* nos canais radiculares de dentes indicados ao retratamento endodôntico utilizando o método de cultura microbiana. No presente estudo *E. faecalis* foi isolado em 20% dos canais radiculares após a remoção da guta-percha, e não caracterizou-se como o microrganismo mais prevalente, concordando com Fouad *et al.* (2005) que isolaram em 22% dos casos de retratamento analisados. Apesar disso, nos casos em que *E. faecalis* esteve presente foi observada uma predominância de unidades formadoras de colônias sobre as outras espécies isoladas. Esse microrganismo tem a capacidade de sobreviver em um ambiente pobre de nutrientes e com uma relação comensal mínima com outros microrganismos (Sundqvist *et al.*, 1998).

Além do isolamento bacteriano em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico, neste estudo também foi detectado fungos (Nair *et al.*, 1990a; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998, Hancock *et al.*, 2001; Peciulienė *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2002; Siqueira & Rôças, 2004) provavelmente provenientes da cavidade bucal (Waltimo *et al.*, 1997; Egan *et al.*, 2002). Somente na coleta inicial (C1) foi observado crescimento de fungos após o plaqueamento da amostra em Ágar Sabouraud Dextrose, sendo todos da espécie *Candida albicans* que também foi encontrado nos estudos de Molander *et al.* (1998), Sundqvist *et al.* (1998) e Pinheiro *et al.* (2003a,b). Waltimo *et al.* (1999) verificaram resistência dos fungos aos medicamentos comumente utilizados no processo de desinfecção endodôntica, o que pode explicar a sua presença em casos de canais com periodontites apicais persistentes. Esses microrganismos apresentam capacidade de sobreviver nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico, em um meio pobre de nutrientes (Sundqvist *et al.*, 1998). Apesar da presença de fungos em C1, nas coletas após PQM e MIC não houve detecção desses microrganismos, como também foi observado após PQM no estudo de Peciulienė *et al.* (2001).

Na segunda coleta (C2), após PQM com clorexidina (CLX) 2% gel como substância química auxiliar houve uma redução microbiana (UFCs) imediata de 99,93% ($p < 0,05$). Também houve redução do número de espécies isoladas. Neste estudo foi observado após PQM ausência de microrganismos em 33% dos casos, enquanto que na infecção endodôntica primária Vianna *et al.* (2006) verificaram eliminação bacteriana em 50% dos canais radiculares. As espécies *Haemophilus aphrophilus*, *Eggerthella lenta* e o gênero *Neisseria* spp. prevaleceram nesse momento. Microrganismos resistentes às medidas de desinfecção podem morrer ou manterem viáveis, dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis e da capacidade de sobreviver em condições de carência nutricional. Os microrganismos que permanecerem viáveis resultarão em fracasso somente se tiverem acesso aos tecidos periapicais, se forem patogênicos e se estiverem em

número suficiente para induzir ou perpetuar uma lesão periapical (Gomes *et al.*, 1996; Lopes & Siqueira, 2004). Acredita-se que a menor eliminação microbiana após PQM referente aos casos de dentes com insucesso endodôntico do presente estudo quando comparado com Vianna *et al.* (2006); está relacionada à complexidade anatômica do canal, à dificuldade em remover uma microbiota que foi modificada anteriormente e resistiu aos procedimentos do tratamento e retratamento endodôntico, causando a cada intervenção uma seleção desses microrganismos no interior do canal radicular.

O preenchimento do canal radicular com soro fisiológico após PQM não é indicado durante o retratamento endodôntico, entretanto foi preconizada essa etapa com objetivo de verificar o efeito residual da clorexidina 2% gel, pois se observa na literatura essa ação após sua remoção (White *et al.*, 1997; Vivacqua-Gomes *et al.*, 2005). Vivacqua-Gomes (2005) afirma que a CLX 2% gel pode melhorar a desinfecção dos canais radiculares, quando usada como medicação intracanal, e ainda apresentaram efeito antimicrobiano residual por 7 dias após sua remoção, impedindo o crescimento de *Enterococcus faecalis*.

Na terceira coleta (C3) houve um aumento significativo de UFCs ($p=0,0178$) em 13 casos, e de espécies microbianas em 10 casos, quando comparados com C2; demonstrando que microrganismos remanescentes podem voltar a colonizar o canal principal (Peter *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2006). A infecção tubular, independentemente da substância química auxiliar utilizada, é de difícil acesso e remoção. Esses microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários e aqueles que resistiram ao PQM podem proliferar e recontaminar o sistema de canais radiculares, como possivelmente ocorreu no caso 5. A penetrabilidade de microrganismos é dependente do período de infecção, tipo de microrganismo presente, localização dos túbulos dentinários, idade do paciente entre outros (Akpata & Blechman, 1982). Deve-se ressaltar também que o soro fisiológico no interior do canal radicular cria condições favoráveis ao crescimento de microrganismos. Neste estudo clínico in vivo, as unidades formadoras de

colônias dos canais preenchidos com soro fisiológico, não alcançaram o número de UFCs obtido na coleta inicial (C1), justificando o efeito residual da CLX 2% gel. Em estudo in vitro observa-se que a substantividade da CLX 2% gel apresentou remoção completa de *Enterococcus faecalis* após PQM e permaneceu ausente após incubação em estufa por 7 dias (Dametto *et al.*, 2005), diferente do presente estudo; isso mostra que uma infecção polimicrobiana persistente, com microrganismos selecionados e resistentes apresenta maior dificuldade de sua eliminação.

Após a reinstrumentação (C4) foi observada uma redução microbiana (UFCs) de 80%, menor que o encontrado após PQM realizado na primeira sessão. É importante lembrar que já houve uma alteração da microbiota, resultante do PQM realizado na primeira e segunda sessão e do período em que o canal esteve preenchido com soro fisiológico. Dessa forma houve uma seleção desses microrganismos no interior do canal radicular, podendo dificultar na eliminação dos mesmos.

Independente da medicação intracanal utilizada houve isolamento de microrganismos. Na coleta realizada após a remoção da medicação intracanal (C5), verificou-se um aumento de cepas viáveis em seis casos quando comparado com C4, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p=0,2423$), independente do tipo da medicação utilizada. Ao comparar a porcentagem de redução entre C1 e C2 (99,93%) com C1 e C5 (99,58%), observa-se que a medicação intracanal não foi superior ao PQM, mostrando que o tratamento endodôntico em várias sessões pode haver uma recolonização e crescimento bacteriano no sistema de canais radiculares. Os gêneros *Propionibacterium* e *Actinomyces* estavam presentes após a remoção da medicação intracanal, e têm sido associados a lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico (Sundqvist & Reuterving, 1980; Sjögren *et al.*, 1988; 1997). Essas bactérias se apresentaram menos suscetíveis aos procedimentos químicos e mecânicos durante a terapia endodôntica (Gomes *et al.*, 1996; Sjögren *et al.*, 1997), e, uma

vez instalados no canal radicular podem atingir os tecidos periapicais e sobreviver externamente ao canal radicular, causando infecções que só podem ser removidas cirurgicamente (Sundqvist & Reuterving, 1980; Sjögren *et al.*, 1988; 1997). 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 achados do presente estudo também verificaram cultura positiva mesmo após o uso da medicação intracanal como observado no trabalho de Zerella *et al.* (2005). No presente trabalho foram utilizados métodos mais eficazes para detecção de microrganismos, mostrando 11 casos positivos em 15, enquanto que Zerella *et al.* (2005) encontraram 12 em 40. Zerella *et al.* (2005) concluíram que caso o retratamento endodôntico não seja concluído em sessão única, a associação Ca(OH)_2 + CLX 2% gel pode ser uma opção, como mostrado no presente estudo, também afirmado por Gomes *et al.* (2006b) e Ercan *et al.* (2007). Além do efeito de barreira física, a ação antimicrobiana do Ca(OH)_2 é melhorada sem interferir nas demais propriedades deste (Gomes *et al.*, 2006b; Souza-Filho *et al.*, 2008). A CLX 2% gel sozinha como medicação intracanal apresenta propriedades favoráveis como amplo espectro antimicrobiano, baixa toxicidade, liberação gradual prolongada (Ferraz *et al.*, 2001; Souza-Filho *et al.*, 2008); e reduz o processo de reabsorção inflamatória (Lindskog *et al.*, 1998); entretanto, ela não funciona por longos períodos como barreira física dentro do canal radicular e sua difusão pelos túbulos dentinários resulta em espaços vazios, propiciando a recontaminação (Gomes *et al.*, 2003b).

6.2 Identificação de microrganismos pelo método de PCR nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

Na literatura observa-se uma prevalência de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas através do método de cultura em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Entretanto, existem trabalhos utilizando método de PCR que também detectaram bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas (Siqueira *et al.*, 2001; Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006a; 2007). Desta forma, optou-se pela investigação de microrganismos utilizando *primers* de espécies Gram-negativas anaeróbias estritas comumente detectadas em infecções endodônticas primárias, pois estes apresentam em sua parede celular endotoxina, i.e. lipopolissacarídeos (LPS) um importante fator de virulência (Farber & Seltzer, 1988) que também foi quantificado neste estudo. Além disso, LPS está associado a casos com sintomatologia dolorosa (Jacinto *et al.*, 2003).

Com a introdução dos métodos moleculares, espécies de treponemas como *Treponema denticola* (Siqueira *et al.*, 2001; Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006a), *T. socranskii* (Baumgartner *et al.*, 2003), *Tannerella forsythia* (Gomes *et al.*, 2006a) espécies de bacilos anaeróbios produtores de pigmento negro (*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*), e *Filifactor alocis* (Siqueira *et al.*, 2001; Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006a; 2007) passaram a figurar como possíveis patógenos endodônticos. A não detecção desses microrganismos através do método de cultura, já foi observada anteriormente por Wasfy *et al.* (1992), Gomes *et al.* (1994a) e Jacinto *et al.* (2003), podendo estar relacionado à presença de espécies não cultiváveis, a espécies não sobreviventes durante as diversas fases do processamento laboratorial e ao baixo

número de células bacterianas impossibilitando a detecção pelo método de cultura.

Muitas espécies são difíceis ou impossíveis de serem cultivadas. Além disso, a identificação por métodos bioquímicos pode não abranger todos os microrganismos que estão envolvidos na infecção por limitações do seu banco de dados ou por características fenotípicas incomuns das cepas (Siqueira & Rôças, 2005). O fato de métodos moleculares identificarem até mesmo as células mortas pode ser também uma limitação do método. Por um lado, esta capacidade pode permitir a detecção de bactérias que não são cultiváveis, ou bactérias fastidiosas que podem morrer durante o processo de coleta, transporte e isolamento. Por outro lado, se a bactéria não estava mais viável no sítio da infecção, a sua detecção pode induzir a uma falsa presunção do seu papel no processo infeccioso.

Das espécies investigadas neste estudo pelo método de PCR foram detectadas através da cultura microbiana apenas *Gemella morbillorum*, *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra* e *Porphyromonas gingivalis*. Algumas bactérias fastidiosas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *Tanerella forsythia*, *Treponema denticola* e *T. socranskii* que não sobreviveram através da cultura microbiana, foram detectadas no método de PCR. Sabe-se que os meios de cultura empregados não permitem o crescimento de todos os microrganismos, além do que essas espécies são sensíveis à presença de oxigênio e a pequena quantidade de células ou a sua viabilidade (Siqueira & Rôças, 2005) não favorece o isolamento desses microrganismos.

Algumas amostras de coletas realizadas após o primeiro PQM (C2), após o segundo PQM (C4) e após uso da MIC (C5) foi verificada através da cultura microbiana ausência de microrganismos, entretanto no método de PCR foi

detectado presença de DNA bacteriano direcionado ao gene 16S rRNA em todas as amostras. Isso se deve a quantidade de células ou a sua viabilidade, mostrando que a PCR apresenta maior sensibilidade técnica variando de 10 a 10² células. A PCR pode detectar um número baixo de células de uma dada espécie microbiana. Por outro lado, a sensibilidade de detecção do método de cultura é de aproximadamente 10⁴ a 10⁵ células microbianas para uma determinada espécie usando meios não seletivos, e 10³ em meios seletivos. (Spratt, 2004; Siqueira & Rôças, 2005). Lembrando também que para um microrganismo ser passível de cultivo, ele deve estar viável. Os métodos moleculares podem detectar células microbianas mortas, uma vez que se baseiam na presença ou ausência do gene 16S rRNA (Siqueira & Rôças, 2005).

Nos casos em que não houve detecção de microrganismos alvos pelo método de PCR e foi observada sua presença pelos métodos bioquímicos (casos P2/C1; P3/C1; P8/C1/C2; P11/C1/C3; P12/C3; P13/C3; P14/C3/C4) pode ser devido à especificidade do *primer* ou a técnica de PCR utilizada. Quando os resultados para os testes bioquímicos e PCR para os *primers* espécies-específicos foram negativos, acredita-se na presença de microrganismos não cultiváveis, pois em todas as coletas observou-se detecção de DNA bacteriano (16S rRNA).

Na coleta inicial (C1), *Parvimonas micra* foi a espécie bacteriana mais frequentemente detectada pelo método de PCR. *P. micra* é um coco Gram-positivo anaeróbio estrito comumente encontrado nas mucosas da cavidade bucal, intestinos e vagina, que possui em sua parede celular peptidoglicana e ácido lipoteicoico, os quais podem estar associados à resposta inflamatória (Gomes *et al.*, 1994a), à sintomatologia aguda e à destruição dos tecidos periapicais (Gomes *et al.*, 1994; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004). 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 metaloproteinase (MMP-9).

Alguns microrganismos que não estavam presentes na coleta inicial foram detectados após PQM, na primeira sessão assim como na segunda e terceira sessão. Após PQM ocorre a exposição de túbulos dentinários com depósitos bacterianos que servem para a manutenção da infecção periapical (Kettering & Torabinejad, 1997). Ørstavik & Haapasalo (1990) e Peters *et al.* (1995) também afirmaram que no interior dos túbulos dentinários, os microrganismos estão protegidos da solução irrigadora, medicação intracanal e dos instrumentos endodônticos, sendo responsáveis pelas infecções persistentes. Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem permanecer vivas, devido às complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (Ida & Gutmann, 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários, reabsorções radiculares externas, podem não ser afetadas pelas medidas usadas no controle da infecção endodôntica (Nair *et al.*, 1990a; 1999).

Na terceira coleta (C3) houve um aumento da frequência bacteriana em 10 casos, aparecendo novas espécies que não foram detectadas em C1 e C2, ou repetindo os mesmos microrganismos que foram detectados nas coletas anteriores. Microrganismos diferentes aos detectados anteriormente podem ser resultado da ação dos instrumentos endodônticos na parede dentinária causando a exposição dos microrganismos no interior dos túbulos dentinários. Aquelas espécies que se repetiram e resistiram ao PQM também podem proliferar e recontaminar o sistema de canais radiculares. É importante lembrar que o soro fisiológico no interior do canal radicular cria condições favoráveis ao crescimento de microrganismos, pois este é uma substância inerte que não apresenta efeito medicamentoso e propriedade de barreira física.

Em todas as amostras permaneceu DNA bacteriano mesmo após protocolos de desinfecção empregados e uso da medicação intracanal. Após o uso da medicação intracanal houve detecção de algumas espécies investigadas (8/14) distribuídos em nove casos. Mesmo utilizando Ca(OH)_2 , uma substância

altamente alcalina não foi capaz de eliminar DNA bacteriano e das espécies estudadas. A alcalinização do meio proporcionada pelo Ca(OH)_2 induz a quebra de ligações iônicas que mantêm a estrutura das proteínas. Como consequência as enzimas perdem sua atividade biológica e ocorre a disfunção do metabolismo celular (Voet & Voet, 1995). O efeito letal do Ca(OH)_2 nos microrganismos ocorrem quando há contato direto com a substância. Em tal condição, a concentração de íons hidroxila é extremamente alta, incompatível com a sobrevivência bacteriana. Clinicamente, nem sempre isso é possível como também afirmado por Siqueira & Lopes (1999). Se o hidróxido de cálcio precisa difundir-se pelos tecidos e a concentração de hidroxilas decresce como resultado da ação de sistemas tampões (bicarbonato e fosfato), ácidos, proteínas e dióxido de carbono, sua efetividade antibacteriana pode ser reduzida ou mesmo impedida (Siqueira *et al.*, 1998).

6.3 Relação bactérias cultiváveis (UFC/mL) e níveis de endotoxinas (EU/mL) com aspectos clínicos e radiográficos de dentes com insucesso endodôntico

Níveis elevados de endotoxinas foram encontrados em dentes que apresentavam maior tempo de tratamento endodôntico inicial (≥ 10 anos). Deve-se ressaltar que a longevidade do tratamento endodôntico depende da estabilidade dimensional do material obturador por muitos anos, com isso a degradação química da guta- percha presente no interior de canais radiculares infectados e presença de lesão periapical ocorre em aproximadamente 5 anos (Maniglia *et al.*, 2007). A oxidação e a perda de massa molar da guta-percha resultam em espaços vazios entre o material obturador e as paredes do canal radicular, assim como a perda do selamento apical, que permite a recolonização bacteriana, gerando a necessidade do retratamento endodôntico. Maiores valores de UFCs foram

encontrados em dentes com obturação inadequada, guta-percha distante 2 mm ou mais do ápice (Hancock *et al.*, 2001), assim como nos casos sintomáticos com dor à percussão e à palpação. Além disso, a periodontite crônica apical pode significar uma infecção extra-radicular; e o biofilme localizado em áreas inacessíveis do espaço pulpar, sobre a superfície radicular e nas lacunas de cimento abriga um grupo de bactérias capazes de degradar a borracha de poliisopreno (Nair *et al.*, 2005).

A microinfiltração coronária (Ray & Trope, 1995; Schwartz & Fransman, 2005) foi uma das principais causas do insucesso do tratamento endodôntico observada neste estudo. Todos os casos analisados apresentou um selamento coronário inadequado baseado nos mesmos parâmetros de avaliação da qualidade da restauração coronária que Pinheiro *et al.* (2003a;b) e Delboni (2009) utilizaram. Nutrientes originados de fluidos teciduais da região periapical ou da cavidade bucal através da microinfiltração coronária, podem servir de substrato para cepas que sobreviveram após o PQM, mantendo a infecção intrarradicular. Dessa forma, deve-se ressaltar a importância do selamento imediato com um material restaurador definitivo tanto entre sessões quanto depois de finalizado o tratamento endodôntico.

Radiograficamente, dentes com lesão periapical, massa obturadora heterogênea, espaços vazios, compactação inadequada e um preparo sem conicidade com paredes irregulares caracterizam um tratamento endodôntico anterior falho (Pinheiro *et al.*, 2003a;b; Delboni, 2009). Outro fator a considerar é a distância da guta-percha em relação ao ápice. Neste estudo, quando essa distância apresentou maior que 2 mm do ápice houve maiores níveis de endotoxinas e crescimento de bactérias cultiváveis. Pinheiro *et al.* (2003a) encontrou mais de 3 microrganismos em canais mal-obturados, mostrando uma correlação estatisticamente significativa, entretanto Delboni (2009) não verificou qualquer associação da microbiota com os achados clínicos e radiográficos.

Siqueira & Roças (2004) encontraram um maior número de espécies bacterianas em canais onde a distância entre o material obturador e o ápice era maior que 2 mm quando comparado com canais obturados no limite de 2 mm ou menos do ápice, corroborando com o presente estudo que foi observado 4 e 4,5 espécies por canal; respectivamente. Foi verificado também neste trabalho que em dentes mal obturados apresentaram maior número de espécies (5 espécies por canal) quando comparado aos dentes bem obturados (3 espécies por canal). Os dentes com obturações bem realizadas possuem de 1 a 5 espécies, enquanto em dentes mal obturados podem apresentar até 30 espécies, mostrando similaridade com dentes não tratados (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003b; Rôças *et al.*, 2004a; Siqueira & Rôças, 2004).

Todos os casos onde havia alguma sintomatologia (dor à percussão, palpação ou prévia), a qualidade da obturação apresentou-se inadequada. Particularmente, canais radiculares com uma limpeza, modelagem e obturação incompleta deixam áreas não instrumentadas, servindo como fonte de infecção (Hancock *et al.*, 2001), em alguns casos com uma microbiota similar a infecção endodôntica primária com predominância de bactérias Gram-negativas (Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; 2006a; Rôças *et al.*, 2008). Observou-se que a maioria dos dentes com guta-percha distante mais que 2 mm do ápice apresentaram dor à percussão e/ou à palpação. Alguns autores (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1991; Jacinto *et al.*, 2005; Martinho & Gomes, 2008) afirmaram que altos níveis de endotoxinas estão associados a presença de sintomatologia clínica.

Correlação positiva foi observada entre elevados níveis de endotoxinas e lesão periapical maior que 5 mm, indicando a participação da endotoxina na reabsorção óssea periapical em dentes com insucesso do tratamento endodôntico. O LPS bacteriano é um potente estimulador da produção de citocinas inflamatórias – interleucina -1 (IL-1) e fator de necrose – alfa (TNF- α) – por diferentes células presentes nos tecidos periapicais através da ativação do receptor TLR4 (*Toll-like*

receptor 4) (Horiba *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 2004). Martinho *et al.* (2010a) demonstraram níveis superiores de IL1- β em dentes com maior tamanho da lesão periapical.

Apesar da redução bacteriana após o preparo químico-mecânico com clorexidina 2% gel e EDTA 17% mostrar-se em 99,93%; a concentração de endotoxina reduziu somente em 60,6%. Independente do preparo realizado em toda extensão do canal radicular, valores de endotoxina foram detectados em todas as amostras analisadas. Isso também se deve não somente ao fato do efeito limitado de detoxificação dos agentes irrigantes como a clorexidina 2% gel sobre o LPS (Gomes *et al.*, 2009a), mas também pela ineficiente ação mecânica dos instrumentos manuais em realizar a remoção do LPS. No estudo de Martinho *et al.* (2010b) verificaram maior porcentagem de remoção de endotoxinas de canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária utilizando instrumentos rotatórios NiTi.

6.4 Detecção e quantificação de endotoxina nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC

A parede celular de bactérias Gram-negativas contém lipopolissacarídeos (LPS), um importante fator de virulência, que exerce uma série de efeitos biológicos e resultam na amplificação de reações inflamatórias (Farber & Seltzer, 1988) e reabsorção óssea nas periodontites apicais (Yamasaki *et al.*, 1992). As endotoxinas são responsáveis pela quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), estimula a liberação de enzimas lisossomais de PMNs, promove a liberação de colagenase dos macrófagos, ativa o sistema complemento, aumenta a temperatura corporal, atrai os osteoclastos (Farber & Seltzer, 1988), altera a estrutura e função de vários órgãos e células, assim como das funções

metabólicas e hemodinâmicas (Martich *et al.*, 1993). Altos níveis de endotoxinas têm sido associados com o desenvolvimento de dor espontânea (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2005;) dor à percussão (Jacinto *et al.*, 2005; Martinho & Gomes, 2008) e dor à palpação (Jacinto *et al.*, 2005) em infecções endodônticas primárias.

Conhecendo o papel da endotoxina na patogênese endodôntica e após detectar bactérias Gram-negativas pelo método de cultura microbiana e PCR espécie-específico nas amostras analisadas, o presente estudo quantificou a concentração de endotoxinas nas coletas realizadas antes e após PQM e após uso da MIC em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical, utilizando o método turbidimétrico (Pyrogente 5000 LAL).

O método turbidimétrico (Pyrogent 5000 LAL) (Martinho *et al.*, 2010a; b) utilizado para quantificação de endotoxina foi escolhido no presente estudo pois é extremamente sensível, com uma larga faixa de concentração (0,01-100 EU/mL) em que os valores de endotoxina podem ser determinados. O método KQCL (0,005-50EU/mL) (Cardoso *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2009) também apresenta elevada sensibilidade na detecção dos níveis de endotoxinas. Por outro lado o método QCL apresenta limitação em relação a sua sensibilidade (0,1-1 EU/mL) (Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009a).

O teste Pyrogente 5000 LAL é capaz de incluir um controle positivo do produto (PPC), o qual essa amostra é contaminada com uma quantidade conhecida de endotoxina; e que a recuperação de endotoxina deve estar entre 50% a 200%, como recomendado pela Farmacopéia Americana.

O ensaio (Pyrogent 5000 LAL) utilizado no presente trabalho possibilitou a detecção de níveis baixos de endotoxinas, como era esperado por se tratar de uma infecção com maior quantidade de bactérias Gram-positivas

(Molander *et al.*, 1998; Peuciliene *et al.*, 2000; Cheung & Ho, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b). Todas as amostras de C1 e C2 apresentaram valores de PPC na faixa entre 50% a 200%, como recomendado pela Farmacopéia Americana.

Em todos os canais radiculares nas coletas C1 e C2 foram verificados níveis de endotoxinas. Isso mostra o envolvimento de bactérias Gram-negativas em infecções endodônticas secundárias (Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006a; Rôças *et al.*, 2008) de dentes com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical, como também detectado no presente estudo esses microrganismos através do método de PCR. Entretanto, nas outras coletas (C3, C4 e C5) não foi encontrado valores validados pela Farmacopéia Americana. A maior frequência de bactérias Gram-positivas, assim como LPS de bactérias Gram-negativas residuais à terapia endodôntica podem inibir/potencializar o LPS da *E. coli* no controle da reação de quantificação de endotoxina. Quando inibidos (valores de PPC detectados inferiores a 50%) ou potencializados (valores de PPC superiores a 200%), os resultados não são validados pela Farmacopéia Americana. Desta forma, os níveis de endotoxinas para as coletas C3, C4 e C5 foram considerados não validados.

Apenas em um caso (P5) houve aumento do nível de endotoxinas. Esse resultado reflete a microbiota obtida por cultura, pois através do método de PCR não houve detecção das espécies investigadas. No método de cultura, quando comparado C1 e C2, foi observada após PQM uma frequência maior de microrganismos Gram-negativos, que possuem em sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS). Os microrganismos isolados são representados pelas espécies *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae*, assim como os gêneros *Capnocytophaga* spp. e *Neisseria* spp.

De uma maneira geral, foram observadas concentrações inferiores de endotoxina (mediana: 3,96 EU/mL) quando comparadas às presentes na infecção

endodôntica primária (mediana: 9,19 EU/mL) (Martinho *et al.*, 2010b). Isso se deve às pressões seletivas existentes nos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente. A falta de nutrientes cria um ambiente favorável a colonização de bactérias Gram-positivas, estando estas em níveis mais elevados que as Gram-negativas, como também verificado por outros autores pelo método de cultura (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003b).

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e de acordo com as metodologias propostas neste estudo pode-se concluir que:

- a)** Os canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical apresentaram através do método de cultura uma infecção polimicrobiana, prevalecendo nas diferentes coletas uma microbiota composta por bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas.
- b)** A técnica de PCR espécie-específico detectou a presença de bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas fastidiosas nas coletas antes e após preparo químico-mecânico (PQM) e após uso da medicação intracanal (MIC).
- c)** A efetividade do uso da MIC sobre os microrganismos foi inferior ao PQM, observado tanto na cultura quanto no PCR, para as espécies estudadas.
- d)** Níveis de endotoxinas foram detectados antes (C1) e após o PQM (C2).
- e)** Elevados níveis de endotoxinas mostraram correlação positiva com maiores tamanhos (>5 mm) da lesão periapical.

8 REFERÊNCIAS*

1. Adib V, Spratt D, NG YL, Gulabilava K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004; 37(8): 542-51.
2. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *J Dent Res.* 1982; 61(2):435-8.
3. Allen RK, Newton CW, Brown CE. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *J Endod.* 1989; 15(6): 261-6.
4. Antonopoulos KG, Attin T, Hellwing E. Evaluation of the apical seal of root canal fillings with different methods. *J Endod.* 1998; 24(10): 655-8.
5. Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. *Técnicas básicas em biologia molecular.* Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2003.
6. Barbosa CAM, Goncalves RB, Siqueira Jr JF, Uzeda MD. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod.* 1997; 5(23): 297-300.
7. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997; 30(3): 155-9.
8. Basrani B, Santos M, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S, Ontario T. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(2): 240-5.
9. Baumgartner JC, Falkler WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod.* 1991; 17(8): 380-3.
10. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2000; 26(12): 695-8.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29(12): 794-7.
12. Bender IB, Seltzer S, Soltanoff W. Endodontic success – A reappraisal of criteria II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 22(6): 790-802.
13. Bergenholtz G, Lekholm U, Milthon R, Heden G, Odesjö B, Engström B. Retreatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res.* 1979; 87(3): 217-24.
14. Bhaskar SN. Periapical lesions – types, incidence and clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 21(5): 657–71.
15. Bos MP, Robert V, Tommassen J. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol.* 2007; 61: 191-214.
16. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981; 89(4): 321-8.
17. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983; 55(3): 307-12.
18. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1(5):170-5.
19. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5): 384-90.
20. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001; 27(5): 325-27.
21. Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins

- in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(3): 85-91.
- 22.Çaliskan MK, Sen BH. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long-term study. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12(5): 215–21.
- 23.Cheung GSP. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J.* 1996; 46(3): 131-8.
- 24.Cheung GSP, Ho MWM. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(6): 332-7.
- 25.Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(1): 81–90.
- 26.Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980; 59(6): 1033–40.
- 27.Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(6): 375-82.
- 28.Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod.* 1998; 24(11): 763–7.
- 29.Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(6): 768-72.
- 30.De Deus QD. *Endodontia.* 5ª edição. Rio de Janeiro: Medsi, 1992.
- 31.Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53(5): 518-23.
- 32.Delboni MG. Identificação dos microrganismos presentes na saliva, na coroa dental e no canal radicular de dentes indicados ao retratamento

endodôntico e análise da suscetibilidade antimicrobiana, dos fatores de virulência e da diversidade genética dos *Enterococcus faecalis* isolados. [Tese] UNICAMP/FOP, 2009.

33. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28(10): 689–93.
34. Egan MW, Spratt DA, NG Y-L, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2002; 35(4): 321-9.
35. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy.* 1964; 15, 87–106.
36. Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G. Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy.* 1964;15: 257–70.
37. Ercan E, Dalli M, Dülgergil T, Yaman F. Effect of intracanal medication with calcium hydroxide and 1% chlorhexidine in endodontic retreatment cases with periapical lesions: an in vivo study. *J Formos Med Assoc.* 2007; 106(3):217-24.
38. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res.* 1982a; 90(2): 134-44.
39. Fabricius L, Dahlén G, Holm S, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res.* 1982b; 90(3): 200–6.
40. Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(4): 278–85.
41. Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. 1. Etiology. *J Endod.* 1988; 14(7): 363-71.

42. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 27(7): 452-5.
43. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2007; 18(4): 294-8.
44. Figdor D. Microbial aetiology of endodontic treatment failure and pathogenic properties of selected species [dissertation]. Umeå University Odontological Dissertations N^o. 79. Umeå (Sweden): Umeå University; 2002.
45. 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): 289-95.
46. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(1): 112-8.
47. Friedman S, Lost C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a Glass Ionomer cement sealer. *J Endod* 1995; 21(7): 384-90.
48. Goldberg F, Artaza LP, De Silvio AC. Influence of calcium hydroxide dressing on the obturation of simulated lateral canals. *J Endod.* 2002; 28(2): 99-101.
49. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994a; 27(6): 291-8.
50. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios.* 1994b; 80(325): 231-43.

51. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996; 29(4): 235–41.
52. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001; 34(6): 424-8.
53. Gomes BPFA, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002a; 28(11): 758-61.
54. Gomes BPFA, Ferraz CC, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J.* 2002b; 13(3): 155-61.
55. Gomes BPFA, Souza SC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003a; 36(4): 267-75.
56. Gomes BPFA, Sato E, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003b; 36(9): 604-9.
57. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-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.
58. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(4): 211-5.

59. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, 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.
60. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006b;102(4): 544-50.
61. Gomes BPFA, 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.
62. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008a; 34(5): 537– 40.
63. Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008b; 105(4): 519-25.
64. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009a; 35(10): 1350-3.
65. Gomes BPFA, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. J Dent. 2009b; 37(1): 76-81.
66. Guerisoli DMZ, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pécora JD. Evaluation of smear layer removal by EDTA and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. Int Endod J. 2002; 35(5): 418-421.

67. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987; 66(8): 1375–9.
68. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 579-86.
69. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J.* 2003; 36(2): 75-85.
70. Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in sustained release device for dentine sterilization. *Int Endod J.* 1992; 25(1): 15-9.
71. Hepworth MJ, Friedman S. Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Canad Dent Assoc.* 1997; 63(5):364-71.
72. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(3): 162-9.
73. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H, Ozeki M. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. *J Endod.* 1989; 15(11): 530-4.
74. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71(4): 492-5.
75. Hoskinson SE, Ng YL, Hoskinson AE, Moles DR, Gulabivala K. A retrospective comparison of outcome of root canal treatment using two different protocols. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93(6): 705–15.

76. Ida RD, Gutmann JL. Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11(4): 199-203.
77. Imura N, Pinheiro ET, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endod.* 2007; 33(11): 1278-82.
78. Jacinto RC, Gomes BPFA, 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): 285-92.
79. Jacinto RC, Gomes BPFA, 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(Pt 8): 777–83.
80. 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; 20:340-9.
81. Kettering JD, Torabinejad M. *Microbiologia e Imunologia* 1997. In: Cohen S & Burns RC. *Caminhos da Polpa.* 6 th. Rio de Janeiro. Koogan SA Mosby CO.
82. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 587–93.
83. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod.* 2000; 26(11): 652-5.
84. Leonardo ML, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J appl Oral Sci.* 2004; 12(2): 93-8.
85. Lifshitz J, Schilder H, Pameijer CH. Scanning electron microscope study of the warm gutta-percha technique. *J Endodon.* 1983; 19(1): 17-24.

86. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1991; 71(5): 603-11.
87. Lin LM; Skribner JE; Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992; 18(12): 625-7.
88. Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, Hong CY. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod.* 2001; 27(3): 185-9.
89. Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14(4): 186-90.
90. Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia: Biologia e técnica.* Rio de Janeiro: Medsi, 2004.
91. Lovdahl PE. Endodontic retreatment. *Dent Clin of North Am* 1992; 36(2): 473-90.
92. Maniglia-Ferreira C, Silva Jr JBA, Paula RCM, Feitosa JPA, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ. Degradation of trans-polyisoprene over time following the analysis of root fillings removed during conventional retreatment. *Int Endod J.* 2007; 40(1): 25-30.
93. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007; 33(2): 114-8.
94. Marquis VL, Dao T, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment Outcome in Endodontics: The Toronto Study. Phase III: initial Treatment. *J Endod.* 2006; 32:(4) 299 -306.
95. Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology.* 1993; 187(3-5): 403-16.

96. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008; 34(3): 268-72.
97. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod.* 2010a; 36(9): 1467-74.
98. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with Rotary NiTi files in the removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod.* 2010b; 36(11): 1766-9.
99. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod.* 2005; 31(5): 359–63.
100. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr.* 1966; 74 (spec issue): 1–380.
101. 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): 475–84.
102. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31(1):1-7.
103. Molven O, Halse A, Fristad I, Macdonald-Jankowski D. Periapical changes following root-canal treatment observed 20-27 years postoperatively. *Int Endod J.* 2002; 35(9): 784-90.
104. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990a; 16(12): 580–8.

105. Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod.* 1990b;16(12): 589-95.
106. Nair PNR, Sjögren U, Schumaker E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. *Int Endod J* 1993; 26(4): 225-33.
107. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1996; 81(1): 93–102.
108. Nair PNR; Sjögren U; Figdor D; Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87(5): 617-27.
109. Nair PNR. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 1997; 13: 121-48.
110. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(2): 231–52.
111. Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(4): 138-41.
112. Nerwich A, Figdor D, Endo D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993; 19(6): 302-6.
113. Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(1): 135-42.

114. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6(4): 142-9.
115. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 2000; 26(10): 593-5.
116. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34(6): 429-34
117. Pécora JD, Ribeiro RG, Guerisoli DM, Barbizam JV, Marchesan MA. Influence of the spatulation of two zinc oxide-eugenol-based sealers on the obturation of lateral canals. *Pesq Odontol Bras.* 2002; 12(2): 127-30.
118. Peters LB, Wesselink PR, Moorers WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J.* 1995; 28(2): 95-9.
119. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J.* 2002; 35(8): 698–702.
120. Peters OA, Barbakow F, Peters CI. An analysis of endodontic treatment with three nickeltitanium rotary root canal preparation techniques. *Int Endod J.* 2004; 37(12): 849 –59.
121. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003a;18(2): 100 –3.
122. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003b; 36(1): 1–11.
123. Pitts DL, Williams BL, Morton TH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod.* 1982; 8(1): 10–8.

124. QUALITY ASSURANCE GUIDELINES, Chicago, American Association of Endodontics, 1-27, 1987.
125. Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root-filling and the coronal restoration. *Int Endod J.* 1995; 28(1): 12-8.
126. Reit C. Decision strategies in endodontics: on the design of a recall program. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3(5): 233-9.
127. Reit C, Dahlén G. Decision making analysis of endodontic treatment strategies in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1988; 21(5): 291–9.
128. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004a; 98(6): 741-9.
129. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004b; 30(5): 315–20.
130. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod.* 2004c; 30(7): 504–8.
131. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira Jr JF. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod.* 2008; 34(8): 926-31.
132. Rocha RA, Silva RA, Assed S, Medeiros AI, Faccioli LH, Pécora JD, Nelson-Filho P. Nitric oxide detection in cell culture exposed to LPS after Er:YAG laser irradiation. *Int Endod J.* 2009; 42(11): 992-6.
133. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9): 3282–9.
134. Safavi KE, Spångberg LSW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod.* 1990;16(5): 207-10.

135. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biologic properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J. Endod.* 1994; 20(3): 127-9.
136. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(1):19-23.
137. Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1994;10(3): 105– 8.
138. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 1975; 1(1): 19-21.
139. Schilder H. Filling root canal in three dimension. *Dent Clin North Amer.* 1967; 11(8): 723-44.
140. Schirmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod.* 2007; 33(5): 536–40.
141. Schwartz RS, Fransman R. Adhesive dentistry and endodontics: materials, clinical strategies and procedures for restoration of access cavities: a review. *J Endod.* 2005; 31(3): 151-165.
142. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon. *J Endod.* 2005; 31(2): 91-6.
143. Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000; 26(12): 751–5.
144. Signoretti FGC. Avaliação in vitro da influência da clorexidina 2% gel no pH, liberação de cálcio e ação sobre endotoxinas do hidróxido de cálcio. [Dissertação] UNICAMP/FOP, 2009.

145. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod.* 2002; 28(2): 94–8.
146. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34: 1-10.
147. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(3): 281-93.
148. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32(5): 361-9.
149. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1): 85–94.
150. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1—current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31(6):411–23.
151. Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 969-981.
152. Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22(12): 674–6.
153. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod.* 1997; 23(3):167-9.
154. Siqueira JF Jr; Batista, MDM; Fraga, RC. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998; 24(6):414-6.
155. Siqueira, JF Jr; Rôças IN; Lopes HP; Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod.* 1999; 25(1): 14-6.

156. 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*. 2001; 34(4): 280-4.
157. Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod*. 2007a; 33(5): 541–7.
158. Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod*. 2007b; 33(6): 667–72.
159. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Riche FNSJ, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(5): 757-62.
160. Sirén EK, Haapasalo M, Ranta K, Salmi P, Kerosuo E. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J*. 1997; 30(2): 91-5.
161. Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J*. 1988; 21(4): 277-82.
162. Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*. 1990;16(10): 498 –504.
163. Sjögren U, Sundqvist G, Nair PNR. Tissue reaction to gutta-percha particles of various sizes when implanted subcutaneously in guinea pigs. *Eur J Oral Scie*.1995; 103(5): 313–21.
164. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30(5): 297–306.

165. Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy – a five year retrospective study. *Int Endod J.* 1993; 26(6): 321-33.
166. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 28-33.
167. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Topics.* 2004; 9: 5–14.
168. Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6(3): 89-96.
169. Stevens RH, Grossman LI. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod.* 1983; 9(9): 372–4.
170. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002; 28(4): 304-10.
171. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7(5): 257–62.
172. Sundqvist G, Reuterving CO. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. *J Endod.* 1980; 6(6): 602-6.
173. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod.* 1998; 85(1): 86-93.
174. Sundqvist G. Life as an endodontic pathogen Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics.* 2003; 6: 3-28.
175. Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA. Twenty years of endodontic success and failure. *J Endod.* 1983; 9(5):198-202.

176. 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.
177. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol.* 1995;10(4): 213–9.
178. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36(11): 733-9.
179. ter Steeg PF, van der Hoeven JS. Development of periodontal microflora on human serum. *Microbial Ecol Health Dis.* 1989; 2(1): 1-10.
180. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod.* 1990; 16(12), 566–9.
181. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(6): 658-66.
182. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3(2): 86-90.
183. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1): 79-84.
184. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006; 39(6): 484-92.
185. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6):1–8.

186. Vianna ME, Gomes BPFA. Efficacy of sodium hypochlorite combined chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 107(4): 585-9.
187. Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. Int Endod J. 2005; 38(10): 697-704.
188. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1995.
189. Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. Int Endod J. 1997; 30(2): 96–101.
190. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. J Endod. 2005; 31(12): 863-6.
191. Wang C, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. J Endod. 2007; 33(11): 1283-9.
192. Wasfy MO, McMahon KT, Minah GE, Falkler WA. Microbial evaluation of periapical infections in Egypt. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7(2): 100-5.
193. Weiger R, Rosendahl R, Löst C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesion. Int Endod J. 2000; 33(3): 219–26.
194. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1997; 23(4): 229-31.
195. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodontal Res. 1996; 31(6): 393–407.
196. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. J Endod. 1992; 18(10): 501-4.

197. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(6): 756-61.
198. Ziebuhr W, Ohlsen K, Karch H, Korhonen T, Hacker J. Evolution of bacterial pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56(9-10): 719 –28.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas presentes no canal radicular de dentes submetidos ao retratamento endodôntico, preparo químico-mecânico e medicação intracanal"**, protocolo nº 139/2008, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Marcos Sergio Endo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/12/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Identification of microorganisms and quantification of endotoxin isolated from root canal of teeth with endodontic failure, chemical-mechanical preparation and intracanal medication"**, register number 139/2008, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes and Marcos Sergio Endo, 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.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

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.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela orientadora Prof^ª. Dr^ª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pelo aluno de mestrado Marcos Sergio Endo, objetivando convidar e formar acordo, por escrito, mediante o qual o indivíduo, parte integrante da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá por livre arbítrio e sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas presentes no canal radicular de dentes submetidos ao retratamento endodôntico, preparo químico-mecânico e medicação intracanal".

II. PROPOSIÇÃO GERAL

Identificar a microbiota de dentes com insucesso endodôntico e quantificar as endotoxinas após o preparo químico-mecânico (PQM) e uso de medicamentos intracanaís (MI).

III. JUSTIFICATIVA

Um maior estudo dos fatores clínicos e das bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico poderia nos levar a uma melhoria das técnicas de combate à infecção e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento. Assim como, avaliar a ação antimicrobiana da medicação intracanal, que é utilizada entre sessões, para preencher os espaços dos canais radiculares. Essa medicação, como o próprio nome diz, pode ter efeito medicamentoso, auxiliando no combate da infecção e ativando a mineralização dos tecidos duros, auxiliando no reparo. Os microrganismos presentes na infecção endodôntica serão isolados e identificados. Os resultados obtidos irão auxiliar na terapia endodôntica, ajudando a entender os insucessos, que acontecem mesmo após o emprego de técnicas adequadas. Com esta pesquisa poderemos verificar quais os microrganismos que sobreviveram após o emprego da medicação, verificar se estes oferecem riscos ao sucesso da terapia. Este e outros questionamentos procuraremos responder neste trabalho.

Além disso, estudos sobre RETRATAMENTO ENDODÔNTICO fazem parte da linha de pesquisa do Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia de nossa disciplina, que foi montado graças ao financiamento da FAPESP. Dessa maneira, o presente trabalho promoverá uma continuidade na linha de pesquisa.

IV. PROCEDIMENTO DO EXPERIMENTO

Seleção dos pacientes

Serão selecionados indivíduos com necessidade de retratamento endodôntico. Serão estudados 15 casos. O retratamento endodôntico será evidenciado pela constatação de uma área radiolúcida na região periapical do dente envolvido, assintomático, indicando a persistência da lesão após o tratamento endodôntico. Serão obtidos os dados relativos ao gênero, idade, doenças sistêmicas e uso de medicamentos. Os pacientes com doenças sistêmicas e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos não serão incluídos no estudo.

Aspectos clínicos e radiográficos

Para cada paciente serão anotados dados pessoais, história médica e história dentária. No exame subjetivo serão anotados dados sobre a condição atual do dente a ser retratado, quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo serão anotados dados tais como: a presença de edema, de fístulas, presença ou não de restaurações no dente tratado endodonticamente, cáries e fraturas.

Serão realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal.

Na análise radiográfica, será avaliada a qualidade da obturação, a presença de lesão periapical relacionada ao dente tratado endodonticamente, a presença de alguma imagem de cárie sob a restauração ou sugerindo uma infiltração coronária neste dente.

Coleta de amostras

Após a abertura coronária, será coletada toda a guta-percha removida do canal radicular durante a desobturação. Serão realizadas cinco coletas microbiológicas do canal radicular, durante a sessão de retratamento endodôntico, dessa forma os voluntários não terão que se deslocar à faculdade apenas para a concretização da pesquisa. Essas coletas serão divididas em três sessões odontológicas, semelhante a qualquer outro retratamento endodôntico, finalizando com a obturação e selamento do dente envolvido.

Para a coleta, os cones de papel absorvente estéril serão introduzidos no comprimento de trabalho pré-estabelecido permanecendo nesta posição por 60 segundos. Este cone, normalmente é usado para secar o canal. A coleta de amostra é simples e faz parte do tratamento endodôntico, não existindo outro método alternativo para tal. A coleta das amostras dos canais radiculares será realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio.

Após as coletas das amostras bacteriológicas, o dente em questão será retratado e restaurado pelo mesmo operador. Além disso, será feito pela Área de Endodontia, um acompanhamento de todos os retratamentos realizados neste experimento, durante, no mínimo, 4 anos.

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP, os recipientes com o material colhido do canal radicular serão processados adequadamente para que se obtenha o isolamento, cultivo e identificação dos microrganismos.

V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS

Não terá nenhum risco de morte ou mudança no seu atendimento convencional, já realizado diariamente nesta Faculdade. O processo é indolor. Se o paciente sentir dor, esta não será devido à coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais.

Os procedimentos desenvolvidos nesse trabalho apresentam em consonância com os tratamentos realizados atualmente na área de Endodontia da FOP/UNICAMP. Os três tipos de medicações intracanaís preconizadas no presente estudo são empregadas na Clínica de Especialização em Endodontia, assim como em algumas outras instituições do país.

Durante todo o tratamento de canal e coleta de bactéria serão utilizados luvas e óculos de segurança para proteção do operador e do paciente.

Se houver dor fora dos dias marcados para o tratamento, o paciente receberá uma assistência imediata dos responsáveis pela pesquisa, assim o mesmo deverá entrar em contato através dos telefones locais descritos a seguir:

(0xx19) 2106 5215 (Laboratório de Endodontia).

(0xx19) 8211-0427 (celular do pesquisador Marcos Sergio Endo).

O paciente também poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs.

Para qualquer informação ou esclarecimento sobre o tratamento, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones citados acima, e-mail: marcosendo@fop.unicamp.br e bpgomes@fop.unicamp.br, assim como no endereço Rua: Regente Feijó, nº 639, centro. Piraciaba – SP.

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Uma cópia deste termo (TCLE) será entregue ao voluntário, portanto o mesmo terá em mãos telefones e endereços para contato.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos na pesquisa.

VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO

Os benefícios esperados afetam indiretamente os voluntários, pois estarão relacionados com o desenvolvimento de um retratamento endodôntico mais eficaz e seguro, com o conhecimento dos microrganismos envolvidos nesses casos.

VII. POSSIBILIDADES DE INCLUSÃO EM GRUPO CONTROLE OU PLACEBO

Não se aplica inclusão de grupo controle ou placebo.

VIII. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA OBTENÇÃO DA INFORMAÇÃO OU TRATAMENTO DA CONDIÇÃO

Não se aplica métodos alternativos.

IX. INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa.

Os resultados da pesquisa ficarão à disposição dos sujeitos envolvidos, sendo preservada a identidade dos mesmos.

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Não haverá necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional (3 sessões).

X. RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

XI. CONSENTIMENTO INFORMADO

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 Marcos Sergio Endo, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Piracicaba, _____ de _____ de 2009/2010.

Nome: _____

RG: _____

Assinatura: _____

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

APÊNDICE II – Meio de Transporte

VMGA III (Viability Medium Göteborg Ágar)

1. Descrição

O meio de transporte VMGA III (Viability Medium Göteborg Ágar) 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, São Paulo - 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) Ágar 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* deve ser separada de acordo com o volume do meio que será preparado. Neste caso, se for preparar 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.
- b) Provetas de 50 mL
- c) 2 frascos vazios de 500 mL
- d) 2 frascos vazios de 1000 mL
- e) 4 funis
- f) 4 tubos de ensaio
- g) 4 espátulas
- h) 1 frasco de Becker pequeno
- i) 2 provetas de 200 mL
- j) 30 pedaços de papel alumínio
- k) 1 vidro de 500 mL

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 89,76 g 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 60 mL + Acetato de fenilmercúrio 0,1 g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar *overnight* a 56°C.
- SOLUÇÃO 2 – Água bidestilada estéril 40 mL + Glicerofosfato de sódio 20 g. 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 60 mL + CaCl anidro 0,24 g ou CaCl₂.6H₂O 0,32 g + KCl 0,84 g + MgSO₄.7H₂O 0,2 g.

Misturar bem as SOLUÇÕES 1, 2 e 3 e resfriar em uma proveta graduada. Adicionar 40 mL de água bidestilada já estéril para completar 200 mL. Ao final, adicionar 0,006 g 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
Ágar	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 25 mL 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 Ágar (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 assepticamente 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 7 dias.

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) Menadione, 25 g (Sigma-Aldrich, EUA), Ref. M5625).

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

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

Dissolver 0,5 g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio 1 N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121 °C por 15 min. Para usar como suplemento, adicionar 1 µL 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 ágar inibe a absorção do oxigênio. O pH do meio é 7,4±0,2.

2.2. Preparo

Dispensar 14,85 g 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°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 de carneiro, 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 12°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
Ágar 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 peptonas 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 15-20°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. Ágar Mitis Salivarius (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos), Ref. 229810
– 500 g

5.1. Descrição

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

5.2. Preparo

Misturar 90 g 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.

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 aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

5.5. 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
Ágar	15g

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

6.1. Descrição

Meio de cultura para isolamento e diferenciação de organismos entéricos.

6.2. Preparo

Misturar 50 g 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)
Peptona	17
Proteose peptona	3,0
Lactose	10,0
Sais biliares número 3	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	13,5
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

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

7.1. 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.

7.2. Preparo

Misturar 42 g 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.

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)
Triptose	20,0
Extrato de fungo	5,0
Dextrose	2,0
Fosfato dipotássico	4,0
Azido de sódio	0,4
Ágar	10
Cloreto de trifenil tetrazólio	0,1

8. Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia, Mumbai, India, Ref. M063 – 500 g)

8.1. Descrição

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

8.2. Preparo

Misturar 65 g 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)
Caseína digerida enzimaticamente	10,0
Dextrose	40,0
Ágar	15

APÊNDICE IV – Coloração de Gram

1. Princípios

É utilizada para o exame microscópico 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	0,8 g
Água destilada	100 mL

b) Iodo de Gram

Componente	Quantidade
Iodeto de potássio	2 g
Cristais de iodo	1 g
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.
- Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, por 1 minuto. Lavar em água corrente.
- Cobrir o esfregaço com a solução de iodo de Gram, por um minuto. Lavar em água corrente.
- Aplicar o descorante por 15 segundos sobre a lâmina.
- Imediatamente, cobrir a lâmina com contracorante, por 30 segundos a 1 minuto.
- Deixar secar no ar, colocando a lâmina em posição vertical.
- 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 ágar. 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 – 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 STREP 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. API STAPH - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

2.1. Descrição

API STAPH 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.

2.2. 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-nafttil fosfato (PAL). 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 *Api Staph Analytical Profile Index*.

3. **Rapid ID 32 A** - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

3.1. **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.

3.2. **Procedimentos para identificação**

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Ágar mais sangue desfibrinado de carneiro 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.

4. Api 20 C AUX

4.1. 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.

4.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de Ágar 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 µL 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 no tubo *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.

5. **API NH system** - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., EUA.

5.1. **Descrição**

O sistema API 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 API 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 score 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 score 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 (*API NH System Code Compendium*).

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

5.2. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado 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. 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 VIII – Extração do DNA microbiano

Os procedimentos de extração foram realizados utilizando-se o conjunto QIAamp DNA mini Kit. (QIAGEN, Valência, Califórnia, EUA, Ref. 51306 – 250 reações).

- 1- Agitar a amostra armazenada em VMGA III e aliquotar 300 µl em um eppendorf de 1,5 mL.
- 2- Centrifugar a 8000 rpm / 5 min.
- 3- Remover sobrenadante.
- 4- Adicionar 180 µl de ATL (1) e 20 µl de Proteinase K (2).
- 5- Agitar e incubar a 56°C por 30 min.
- 6- Adicionar 200 µl de AL (3).
- 7- Agitar e incubar a 70°C por 10 min em banho seco.
- 8- Adicionar 200 µl de etanol 100% (armazenado na geladeira).
- 9- Agitar e transferir para os tubos com filtros/colunas (Kit QIAamp Mini Spim Collum).
- 10- Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
- 11- Transferir o filtro para outro tubo vazio do kit.
- 12- Adicionar 500 µl de AW1 (4).
- 13- Centrifugar 8000 rpm / 1 min.
- 14- Transferir o filtro para outro tubo vazio do kit.
- 15- Adicionar 500 µl do AW2 (5).
- 16- Centrifugar a 13000 rpm / 3 min.
- 17- Transferir o filtro para um *eppendorf* normal de 1,5 mL com tampa.
- 18- Adicionar 100µl do eluente AE (6).
- 19- Aguardar 3 min.
- 20- Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
- 21- Guardar o DNA extraído a -20°C.

APÊNDICE IX – Métodos para realização das Técnicas Moleculares de PCR.

PREPARO DOS *PRIMERS*

Quando receber os *primers*, fazer a rehidratação 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 1 mL de água Milli-Q 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.

Massa molecular do soluto = soma das massas atômicas que compõe o soluto.

Por isso, quando misturarmos o *primer* (pó) que está na concentração em nmol com 1 mL 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 (100 mM dNTPs, 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 25 mM.

Então, será preparada uma solução mãe com V_{FINAL} de 20 μL e molaridade final de 25 mM.

5 μL de ANTP + 5 μL de GNTP + 5 μL de CNTP e 5 μL 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 .

$$10 \mu\text{L } V_{\text{mae}} + 90 \mu\text{L } \text{água milli-Q.}$$

100 μL de SOLUÇÃO DE TRABALHO a 2,5 mM.

PREPARO DA MISTURA PARA A REAÇÃO DE PCR

A solução para a reação de PCR tem vários componentes:

- *PRIMER 1*
- *PRIMER 2*
- 10x PCR *Buffer*
- MgCl_2
- 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 estão as referências das concentrações e/ou volumes de cada um dos componentes. Então, muitas vezes os reagentes que o artigo sugere e os que possuímos no laboratório têm concentrações diferentes. Assim deve-se 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 μL (volume de uma amostra) o autor usou:

- 6 pmol de *PRIMER A*
- 6 pmol de *PRIMER B*
- 100 μM de dNTPs
- 2 U TaqDNA *Polymerase*
- 3 μL 10x PCR *Buffer*

Para os *PRIMERS A* e B, o autor usou:

6pmol em 30 μL , ou seja:

$$6\text{pmol} / 30\mu\text{L} = 0,2 \text{ pmol}/\mu\text{L}$$

Na equação, 1 pmol/1 μL = 1 μM .

Então temos que a molaridade dos *primers* usada é 0,2 μM .

A concentração dos nossos *primers* é 5 μM .

Quanto se pegará do nosso *primer*, em μL , 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 μL de cada um de nossos *primers*.

Para as dNTPs

O autor usou 100 μM dNTPs em 30 μL .

Solução de Trabalho de dNTPs a 2,5 mM.

$$M_{\text{dNTP}} \times V_{\text{dNTP}} = M_{\text{ARTIGO}} \times V_{\text{ARTIGO}}$$

$$2,5 \text{ mM} \times V_{\text{dNTP}} = 0,1 \text{ mM} \times 30 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{PRIMER}} = 1,2 \mu\text{L}$$

Deve-se pegar um volume de 1,2 μL de nossa solução de trabalho e acrescentar aos 30 μL da solução para PCR para obtermos a mesma concentração do artigo.

Para a TaqDNA Polymerase

Se tiver 2U no artigo, colocar 2 μL de Taq.

Se tiver 5U no artigo, colocar 5 μL de Taq.

O CLORETO DE MAGNÉSIO é opcional, mas ele favorece a reação. Das concentrações testadas, a que funcionou melhor foi 2 μL . 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 μL sugeridos pelo artigo. Então, somam-se os volumes de todas as outras soluções e coloca a quantidade que falta para 30 μL .

PREPARO DA MISTURA PARA A SOLUÇÃO DE PCR

COMPONENTES	30 μL	MOLARIDADE	MASTER MIX (x23)
PRIMER A	1,2 μL	0,2 μM	27,6 μL
PRIMER B	1,2 μL	0,2 μM	27,6 μL
10x PCR <i>Buffer</i>	3 μL		69 μL
MgCl ₂	2 μL	2 mM	46 μL
Taq	1 μL		23 μL
dNTPs	1,2 μL		27,6 μL
H ₂ O	19,4 μL		446,2 μL
DNA amostra	1 μL	→	1 μL

O *MASTER MIX* é uma solução geral que se faz para ser utilizada em todas as amostras.

Em um *Eppendorf* de 200 μL , adicionar 29 μL de *Master Mix* + 1 μL 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 o gel da cuba de eletroforese que iremos usar.

Misturar os seguintes componentes, para obter TBE 1x:

100 mL de TBE 10x + 900 mL 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 (30 mL)

- 30 mL de TBE 1%
- 0,30 g de agarose.

Bandeja Grande (100 mL)

- 100 mL de TBE 1%
- 1 g de agarose.

1. Colocar no microondas por 1 minuto. Verificar sua transparência. Caso necessário colocar mais alguns segundos.
2. Aguardar um tempo para esfriar.
3. Colocar o brometo de etídeo (CUIDADO MUITO TÓXICO)
4. Verter na bandeja.

5. Colocar o pente e esperar esfriar.

Preparar uma SOLUÇÃO DE TRABALHO de Brometo de Etídeo a uma concentração de 0,5 µg/mL.

Para um gel de 100 mL, colocamos 50 µL.

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

Marcador: 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen cat nº 15628-019) 50 µg.

Misturar 3 µL do *Ladder* com 2 µL do *Loading Dye Solution* em parafilme. Colocar esta mistura no primeiro casulo para que possam servir como controle.

2. COLOCAÇÃO DAS AMOSTRAS NA AGAROSE

Misturar em parafilme 1 µL de *Loading Dye Solution* e 5µL da reação de PCR.

3. FONTE DE ELETROFORESE

Programar em: 80 V e 120 mA, por 40 minutos a 1 hora.