

FREDERICO CANATO MARTINHO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINAS DE DENTES COM INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS E SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em Clínica
Odontológica, Área de Endodontia.

Orientador: Profa Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

PIRACICABA

2007

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

M365a Martinho, Frederico Canato.
Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana. / Frederico Canato Martinho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Lipopolissacarídeos. 2. Bactérias. 3. Canal radicular. 4. Agentes antibacterianos. 5. Sintomas clínicos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Microbiologic investigation, quantification of endotoxin and antimicrobial susceptibility in primary endodontic infection and the salivary carriage of selected endodontic pathogens

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Lipopolysaccharides. 2. Bactéria. 3. Dental pulp cavity. 4. Anti-bacterial agents. 5. Symptoms, clinical

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Carlos Henrique Gomes Martins, Alexandre Augusto Zaia

Data da Defesa: 30-11-2007

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 30 de Novembro de 2007, considerou o candidato FREDERICO CANATO MARTINHO aprovado.

Handwritten signature of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes in blue ink.

PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Handwritten signature of Carlos Henrique Gomes Martins in brown ink.

PROF. DR. CARLOS HENRIQUE GOMES MARTINS

Handwritten signature of Alexandre Augusto Zaia in blue ink.

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

Dedico este trabalho....

... À minha mãe, MARIA AMÉLIA CANATO MARTINHO....quem me acolhe e acolhe toda a minha família, nos momentos de alegria, de tristeza, de incertezas e desesperos....“é difícil falar sem respirar fundo”...sempre nos mostrando o lado racional, espiritual e emocional de se viver. E como uma mãe “coruja”, comemora orgulhosamente essa grande vitória em minha vida.

...Ao meu pai, JOSÉ LUIS MARTINHO, que com seu espírito de guerreiro e sua garra para lutar, serviu de exemplo para eu chegar aonde estou e a seguir a minha vida sempre lutando com dignidade, perseverança e honestidade, sabendo aceitar as derrotas e as vitórias alcançadas.

...Aos meus irmãos, FERNANDO e FELIPE, meus grandes exemplos de vida... que acompanham a minha jornada pelo mundo afora, me aconselhando, me direcionando e me ajudando nas “curvas” estreitas da vida...

Agradeço...

...A Deus...

...que em todas as manhãs, me concede a benção de um novo dia....para que eu percorra o caminho que me trilhaste...em busca da felicidade.

...que durante o dia, me concede o dom da compreensão para melhor convívio entre os irmãos...e os dons da sabedoria e da inteligência para concretização das tarefas árduas...

...que em todas as noites, me concede a benção de poder descansar, de poder agradecer e de sonhar por um dia melhor...

Agradeço...

...À minha orientadora, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pelo exemplo de líder e excelência profissional...fazendo de seus orientados grandes profissionais...tirando o que temos de bom...e nos convencendo a acreditar que somos melhores ainda... fazendo-nos sentir amados....e nos capacitando para tornarmos verdadeiros membros de uma sociedade intelectual...

Agradeço...

... À Helena Rosa Campos Rabang....

...por ser mais do que uma amiga...

...por ser uma pessoa muito especial em minha vida...

...por ter sido minha grande mestre...

...por ter me pego em seus braços para caminhar...

...por acreditar em minha competência...

...por me fazer acreditar que sou capaz...

...por vibrar com minhas conquistas...

...por comemorar minhas vitórias...

...por sofrer com minhas derrotas...

...por me orientar nas incertezas da vida...

...por confiar em meus passos...

...por ajudar nos momentos de dificuldades....

... por me ensinar a lutar nos momentos de guerra...

...por tudo conquistado em minha vida profissional....

...por acreditar num sonho dentro de mim...

...que com o passar dos dias vem se tornando realidade...

Agradeço...

...À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, de quem recebi apoio necessário para realização deste trabalho.

...Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, titular da disciplina de Endodontia, por quem fui recebido com muito carinho.

...Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.

...Aos Prof. Drs. Da área de Endodontia, Caio Cezar Randi Ferraz, José Flávio Affonso de Almeida, pelo exemplo de competência.

...Ao Professor Hernani Abadi, da disciplina de Endodontia da Universidade Estácio de Sá, um grande amigo e exemplo de competência.

...Aos Professores Colaboradores Morgana Eli Vianna e Rogério Castilho Jacinto, pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Agradeço...

....Aos meus grandes amigos da pós-graduação: Maraisa Greggio Delboni, Francisco Montagner, Gisele Abi-Rached, Fernanda Signoretti, Luciano Cintra, Vanessa Berber, Danna Mota, Ana Carolina Rocha Lima, Thais Arcossi, Juliana Nascimento...

....Aos grandes amigos e colaboradores: Geovania de Almeida, Wanderly de Almeida Santos, Adailton dos Santos Lima e Rubens Payão.

...Aos Professores e amigos da Marinha: Fernando Vilhena e Cláudio Pereira.

....Ao instrutor de Marinha e grande amigo: Marcelo Ghetti.

....Aos amigos da especialização da Marinha: Tatiana Motta David, Thaís de Azevedo Barroso, Poliana de Jesus Penha da Silva, Laura Sylvia de Souza e Mello, Graziela Lopes da Silveira, Hilda Irene Gentil Bastos, Daniel Taveira Campos e José Roberto Oleiniski.

RESUMO

O conhecimento das espécies microbianas assim como da suscetibilidade das mesmas à terapia endodôntica é importante para o sucesso do tratamento. Sendo assim, a proposta do presente estudo foi:

- 1) Analisar a microbiota endodôntica de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical (C1) e correlacionar com os sinais e sintomas clínicos;
- 2) investigar mudanças microbiológicas após o preparo químico-mecânico (PQM) (C2);
- 3) investigar a presença de *Enterococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias na saliva dos pacientes submetidos a terapia endodôntica;
- 4) quantificar endotoxinas antes (C1) e após PQM (C2);
- 5) determinar *in vitro* a suscetibilidade antimicrobiana de alguns microrganismos isolados das infecções endodônticas primárias.

Amostras microbiológicas foram coletadas da saliva e do canal radicular de 30 pacientes. Foram identificados 182 microrganismos nos canais radiculares, sendo 65,38% anaeróbios estritos. As espécies mais frequentemente encontradas foram *P. micros* (63,3%), *P. intermedia* (50%), *S. mitis* (30%). Associações positivas foram encontradas entre dor à percussão e *E. lentum*; dor à palpação e *G. haemolysans* e *E. lentum*; fístula e *P. micros*; exsudato purulento e *Bifidobacterium* spp. As espécies *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. foram analisadas e mostraram-se suscetíveis a ação da amoxicilina e da mesma associada ao ácido clavulânico. Maiores concentrações de endotoxinas foram quantificadas nos dentes com sintomatologia clínica. Associação positiva entre LPS e a presença de dor à percussão foi encontrada ($p < 0,01$) Conclusão: A infecção endodôntica primária caracterizou-se ser do tipo mista e polimicrobiana, com predomínio de microrganismos anaeróbios estritos, principalmente bacilos Gram-negativos; a presença de sinais e/ou sintomas clínicos mostrou estar relacionada com determinadas espécies tais como *Eubacterium lentum*, *Gemella haemolysans*, *Peptostreptococcus micros* e *Bifidobacterium* spp. comumente isoladas em infecções endodônticas primárias; *Candida* spp. e *Enterococcus* spp. foram mais frequentemente isolados da saliva do que as *Enterobacteria* spp. O isolamento das espécies *C. albicans* e *E. faecalis* no canal radicular foram associados com a identificação das espécies na saliva; o PQM dos canais radiculares foi eficaz na redução do número de microrganismos. Mudança na microbiota foi encontrada após PQM. Amoxicilina associada ao ácido clavulânico mostrou ser uma potente combinação contra microrganismos envolvidos na infecção de origem endodôntica. Altas concentrações de endotoxinas nos canais radiculares parecem estar relacionadas com a presença de sintomatologia clínica, particularmente com a dor à percussão. O PQM foi capaz de reduzir a concentração inicial de endotoxinas em todos os canais radiculares, entretanto não foi capaz de eliminá-las.

Palavras-chave: microrganismos; canal radicular; antibiótico; endotoxina.

ABSTRACT

Bacteria and their by-products play an important role in the etiology and development of pulp and periapical diseases. The knowledge of endodontic microbiota and its susceptibility to endodontic therapy is important to a successful treatment. Therefore the aims of this study were: 1) to analyse the root canal microbiota in infected teeth with pulp necrosis and periapical lesions (C1) and its correlation with the clinical signs and symptoms; 2) to investigate the variations in the susceptibilities of endodontic microflora to biomechanical procedures (C2); 3) to investigate *Candida* spp., *Enterococcus* spp. and enterobacteria in saliva from the patients under endodontic therapy; 4) to quantify endotoxins before (C1) and after chemo-mechanical preparation (CMP) (C2); 5) to determine *in vitro* the antimicrobial susceptibility rates of the microorganisms recovered from the root canals with primary endodontic infections. Thirty root canals were microbiologically sampled before (C1) and after CMP (C2). At the baseline samples (C1), a total of 182 microorganisms were identified. Strict anaerobic or microphilic species predominated in 65.38%. *P. micros* (63.3%), *P. intermedia* (50%), *S. mitis* (30%) were the most frequent species recovered from the root canals at the baseline samples (C1). Associations between tenderness to percussion and the presence of *E. lentum*; pain on palpation and *G. haemolysans* and *E. lentum*; sinus tract and *P. micros*; Purulent exudate and *Bifidobacterium* spp. ($p < 0.05$) were found. *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. were susceptible to amoxicillin and amoxicillin + clavulanate. Higher levels of endotoxin were detected in teeth with clinical symptomatology. A positive association was found between the presence of LPS and tenderness to percussion ($p < 0.01$). It was concluded that microbiota from infected root canals with pulp necrosis and periapical lesions was comprised by a mixed and polymicrobial flora, dominated by strict anaerobes, particularly Gram-negative rods. Signs and symptoms seemed to be related to the presence of specific bacteria species *Eubacterium lentum*, *Gemella haemolysans*, *Peptostreptococcus micros* e *Bifidobacterium* spp.. *Candida* spp. and *Enterococcus* were more frequently recovered from saliva than *Enterobacteria* spp. Isolation of *C. albicans* and *E. faecalis* from root canals were associated with their identification in the saliva samples. CMP was efficient in reducing the number of microorganisms. Changing in root canal flora was detected after endodontic procedures. Amoxicillin associated with clavulanate was an effective and a strong antimicrobial agent against microorganisms involved in endodontic infections. High contents of LPS seem to be related to the presence of clinical symptomatology, particularly tenderness to percussion. CMP was effective in reducing the initial amount of endotoxin in all root canal samplings but was not able to eliminate it.

Key-words: microorganisms, root canal, symptomatic, endotoxin, antibiotics.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relato na literatura do isolamento de leveduras em canais radiculares. **Página 28**
- Tabela 2.** Estabelecimento da curva padrão nas concentrações 1,0 EU/mL, 0,5 EU/mL, 0,25 EU/mL, e 0,1 EU/mL. (* Potência de 25 EU/mL) **Página 96**
- Tabela 3.** Procedimentos para realização de testes cromogênico LAL (QCL – 1000). **Página 98**
- Tabela 4.** Características clínicas e radiográficas dos 30 dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical. **Página 104**
- Tabela 5.** Distribuição bacteriana das coletas realizadas antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares avaliados. **Página 106**
- Tabela 6.** Número de espécies microbianas isoladas dos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2). **Página 109**
- Tabela 7.** Distribuição dos microrganismos isolados antes (C1) e após (C2) o preparo químico-mecânico dos canais radiculares de acordo com as características morfológicas. **Página 111, 112**
- Tabela 8.** Perfil da microbiota isolada na infecção endodôntica primária com presença de lesão periapical crônica em dentes sintomáticos e assintomáticos. **Página 114**
- Tabela 9.** Frequência de microrganismos isolados na saliva dos 30 pacientes com infecção endodôntica. **Página 116**
- Tabela 10.** Distribuição da presença de *E. faecalis* e *C. albicans* na saliva e no canal radicular. **Página 116**
- Tabela 11.** Valores interpretativos dos “breakpoints” (pontos de corte) para determinação da suscetibilidade/resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos testados de acordo com a metodologia empregada. **Página 117**
- Tabela 12.** Valores referentes aos intervalos de MIC, a concentração mínima inibitória de 50% (MIC50) e 90% (MIC90) em µg/ml das cepas analisadas e percentual de suscetibilidade das espécies testadas. **Página 120, 121**
- Tabela 13.** Quantificação de endotoxina (Eu/ml) antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos 24 canais radiculares. **Página 123**
- Tabela 14.** Concentração de endotoxinas (Eu/ml) nos casos sintomáticos (dor à percussão, DAP, e dor à palpação, DPP) e assintomáticos. **Página 124**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas da identificação microbiana A- Cultura primária/ análise microscópica, B- Isolamento bacteriano e determinação do requerimento gasoso, C- Classificação pela coloração de Gram, D- Teste de fluorescência em UV, E- Teste de catalase, F- Teste de oxidase, G- Teste bioquímico de identificação (rapid ID 32 A). **Página 89**
- Figura 2.** Procedimentos para realização do E-test **Página 93**
A - Cultura pura, B - Obtenção de colônias para preparo do inóculo, C - Preparo do inóculo bacteriano, D - Agitação do inóculo bacteriano, E - Verificação da turbidez no espectrofotômetro, F - E-test, G - Fita do E-test na placa, H - Incubação na câmara de anaerobiose, I - Halo de inibição e elipse.
- Figura 3.** Componentes para quantificação de endotoxinas **Página 95**
A- Teste QLC-1000, B- Reagentes do teste QLC-1000, C- Placas 96 wells, D- Leitor de elisa.
- Figura 4.** Curva padrão. **Página 97**
- Figura 5.** Disposição das amostras, curva padrão e controle negativo nas placas. **Página 98**
- Figura 6.** Frequência em valores percentuais dos microrganismos isolados antes (C1: 182 microrganismos) e após o preparo químico-mecânico (C2: 28 microrganismos) de acordo com coloração de Gram e requerimento gasoso. **Página 107**
- Figura 7.** Perfil da microbiota em % quanto à coloração de Gram e requerimento gasoso antes (C1: 182 microrganismos) e após o preparo químico-mecânico (C2: 28 microrganismos). **Página 107**
- Figura 8.** Frequência do número de espécies isoladas nos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2). **Página 108**
- Figura 9.** Frequência em valor percentual dos gêneros bacterianos isolados de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical. **Página 110**
- Figura 10.** Percentual de suscetibilidade de espécies bacterianas isoladas de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, benzilpenicilina, clindamicina, cefaclor, eritromicina, metronidazol, clorafenicol. **Página 119**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	Página 1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	Página 3
2.1.	Microbiota na infecção endodôntica primária e na saliva	Página 3
2.1.1.	Microbiota dos canais radiculares	Página 3
2.1.2.	Microbiota da saliva e do canal radicular	Página 26
2.2.	Desinfecção dos canais radiculares	Página 33
2.2.1.	Substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico	Página 33
2.2.2.	Ação do hipoclorito de sódio na dissolução de tecido orgânico	Página 35
2.2.3.	Ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio utilizado como substância química-auxiliar no preparo dos canais radiculares	Página 37
2.2.4.	Estudos <i>in vitro</i> da redução antimicrobiana	Página 40
2.2.5.	Estudos <i>in vivo</i> da redução microbiana	Página 45
2.3.	Antibióticos nas infecções endodônticas	Página 49
2.3.1.	Antibióticos de uso na Endodontia	Página 50
2.3.2.	Padrões de resistência aos antibióticos	Página 56
2.3.3.	Teste de suscetibilidade antimicrobiana	Página 59
2.3.4.	Suscetibilidade antimicrobiana de espécies isoladas em infecções endodônticas pelo método E-test	Página 61
2.4.	Endotoxinas	Página 67
2.4.1.	LPS – Enterobactérias x Bactérias orais	Página 70
2.4.2.	LPS nos canais radiculares	Página 71
2.4.3.	Limulus Amebocyte Lysate (LAL-QLC1000)	Página 78
3.	PROPOSIÇÃO	Página 79
4.	MATERIAL E MÉTODOS	Página 81
4.1.	Microbiota na infecção endodôntica primária e na saliva	Página 81
4.2.	Efeito dos agentes antimicrobianos sistêmicos sobre microrganismos	Página 91
4.3.	Quantificação de Endotoxinas	Página 94
4.4.	Análise estatística	Página 101
5.	RESULTADOS	Página 103
5.1.	Microbiota na infecção endodôntica primária e na saliva	Página 103
5.1.1.	Análise clínica e radiográfica	Página 103
5.1.2.	Composição da microbiota da infecção endodôntica primária	Página 105
5.1.3.	Aspectos clínicos x presença de microrganismos	Página 113
5.1.4.	Microbiota após o preparo químico-mecânico	Página 114
5.1.5.	Microbiota da saliva	Página 115
5.2.	Efeito dos agentes antimicrobianos sistêmicos sobre microrganismos	Página 117

5.3.	Quantificação de endotoxinas nos canais radiculares infectados antes e após o preparo químico-mecânico	Página 122
6	DISCUSSÃO	Página 125
6.1.	Microbiota na infecção endodôntica primária e na saliva	Página 125
6.1.1.	Composição da microbiota da infecção endodôntica primária	Página 125
6.1.2.	Aspectos clínicos x presença de microrganismos	Página 133
6.1.3.	Microbiota da saliva	Página 136
6.1.4.	Microbiota após o preparo químico-mecânico	Página 138
6.2.	Efeito dos agentes antimicrobianos sistêmicos sob microrganismos	Página 141
6.3.	Quantificação da endotoxina nos canais radiculares infectados antes e após o preparo químico-mecânico	Página 149
7	CONCLUSÃO	Página 153
	REFERÊNCIAS	Página 155
	APÊNDICES	Página 189

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão direta ou indiretamente envolvidos na maioria das doenças pulpares e dos tecidos perirradiculares. O conhecimento das bactérias associadas com as lesões endodônticas é importante no desenvolvimento e entendimento do processo patológico e no estabelecimento de uma razão racional para o tratamento.

O tratamento endodôntico, ao utilizar métodos químico-mecânicos, busca romper o equilíbrio do ecossistema microbiano com a finalidade de promover a desinfecção dos canais radiculares. A eliminação dos microrganismos dos canais radiculares infectados tem sido uma constante preocupação na Endodontia, demonstrada por pesquisas que avaliaram a eficácia da instrumentação mecânica e a influência da irrigação e medicação intracanal (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Tronstad *et al.*, 1990). Ainda hoje, o melhor e mais seguro método utilizado para descontaminar o sistema de canais radiculares é a criteriosa limpeza do conteúdo séptico-necrótico através da instrumentação e irrigação (Schilder, 1974; Vianna *et al.*, 2007).

A simples ação mecânica dos instrumentos endodônticos é capaz de reduzir a carga bacteriana no interior dos canais radiculares, porém, debris são altamente encontrados em canais radiculares preparados sem soluções irrigadoras. Para tanto, é importante ressaltar a necessidade da utilização de substâncias auxiliares com o intuito de promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que auxiliarão na lubrificação do canal durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de “*smear layer*”, na desinfecção, eliminação do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (Spångberg, 1982; Byström & Sundqvist, 1983).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante endodôntico mais utilizado atualmente (Ercan *et al.*, 2004; McGurkin-Smith *et al.*, 2005; Tanomaru-filho *et al.*, 2006). As pesquisas têm mostrado que apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro eliminando bactérias vegetativas, esporos bacterianos, fungos, protozoários e vírus (Siqueira *et al.*, 1998; McDonnel & Russel, 1999; Gomes *et al.*, 2005a).

Processos inflamatórios e sintomatologia dolorosa nas infecções endodônticas estão intimamente relacionados com os componentes celulares das bactérias anaeróbias

Gram-negativas, como as endotoxinas e outros componentes da parede celular (Farber *et al.*, 1988, Horiba *et al.*, 1991). Segundo Gomes (1995) e Siqueira & Uzeda (1997) as bactérias utilizam fatores de virulência e componentes estruturais (cápsula, LPS, peptidoglicano, fímbrias, lipoproteína e ácido lipoteicóico), para a indução de um processo infeccioso.

O papel da endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo- LPS) tem sido salientado por iniciar e/ou exacerbar a resposta inflamatória (Dahlén, 1980; Horiba *et al.*, 1992; Barthel *et al.*, 1997). A presença de endotoxinas em canais infectados contribui para o aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissores nas terminações nervosas das áreas de lesão, potencializando a sensação dolorosa (Seltzer *et al.* 1994), fazendo com que as reações periapicais sejam sintomáticas ou perpetuem.

O teste cromogênico de Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL) foi previamente utilizado para quantificação de endotoxinas plasmáticas (Fukui *et al.*, 1989), em dentes com polpa necrosada (Jacinto *et al.*, 2003; Vianna, 2006; Vianna *et al.*, 2007), em lesões cáries e polpa dental (Khabbaz *et al.*, 2000; Khabbaz *et al.*, 2001).

A neutralização da porção ativa do LPS bacteriano com o uso de substâncias químicas auxiliares é controversa. De acordo com Buck *et al.* (2001), o hipoclorito de sódio na concentração aproximada de 2.6%, foi capaz de neutralizar moléculas de LPS. Entretanto, Tanomaru *et al.* (2003) mostraram que o preparo químico-mecânico com diferentes soluções irrigadoras, incluindo o hipoclorito nas concentrações de 1% e 5%, não foi capaz de inativar as endotoxinas.

Durante o tratamento endodôntico, em casos especiais, faz-se necessária a utilização de antibióticos sistêmicos. Os antibióticos devem ser empregados conjuntamente ao debridamento mecânico e processos de drenagem em situações de infecções periapicais agudas, assim como na profilaxia antibiótica de pacientes de risco de endocardite bacteriana durante a terapêutica endodôntica (Abbott *et al.* 1990; Andrade, 1999).

A realização do teste de suscetibilidade antibiótica é de suma importância, uma vez que a resistência de bactérias a agentes antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos. Por isso, informações sobre o antibiótico adequado contra determinados microrganismos são necessárias (Hecth *et al.*, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MICROBIOTA NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA E NA SALIVA

2.1.1. Microbiota dos canais radiculares

Até o final do século XIX, não se tinha conhecimento do papel dos microrganismos orais no desenvolvimento e na perpetuação de alterações pulpares e inflamatórias. Miller (1894) relatou a associação entre bactérias e patologias pulpares/ perirradiculares ao analisar material coletado de canais radiculares através de bacterioscopia do esfregaço das amostras, no qual relatou a existência de três tipos morfológicos básicos de células bacterianas: cocos, bacilos e espirilos. Verificou também uma variedade de células bacterianas, sugerindo que a microbiota de dentes com canal exposto ao meio bucal possuía composição diferente quanto à localização, se na câmara pulpar ou no canal radicular propriamente dito, encontrando dificuldades em cultivar muitas delas, vistas apenas na microscopia.

Entretanto, os achados, embora pioneiros, não eram suficientes para o estabelecimento de uma relação causal entre os microrganismos e as patologias de origem endodôntica. Dois eventos que ocorrem simultaneamente não necessariamente representam uma relação de causa e efeito.

Somente anos mais tarde, Kakehashi *et al.* (1965) confirmaram definitivamente o papel importante desempenhado por bactérias na etiopatogenia das doenças pulpares e perirradiculares, realizando exposição de polpas dentais de ratos convencionais e germ-free ao meio bucal, observando a resposta tecidual através de métodos histológicos. Enquanto que nos animais convencionais houve o desenvolvimento de uma inflamação do tipo severa ou necrose pulpar associadas a lesões perirradiculares, nos animais germ-free, este tipo de resposta não ocorreu. Na ausência de microrganismos, as polpas de animais germ-free se

reparam por deposição de dentina neoformada na área de exposição, isolando o tecido pulpar da cavidade bucal.

Mac Donald *et al.* (1957) identificaram a presença de bactérias em canais com polpas não-vitais de dentes traumatizados, sugerindo a capacidade de bactérias entrarem no sistema de canais radiculares de dentes não vitais através da circulação sangüínea sistêmica ou via linfática e vasos sanguíneos do periodonto.

Até a metade da década de 70, devido ao desconhecimento das técnicas de anaerobiose, investigações relatavam que os microrganismos isolados dos canais radiculares eram predominantemente anaeróbios facultativos. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Enterococcus* spp. *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Candida albicans* eram freqüentemente isolados de canais radiculares infectados (Waterman *et al.*, 1998; Seltzer & Farber, 1994; Gomes, 1995; Siqueira & Uzeda, 1997).

No início dos anos 70, o surgimento de novas técnicas laboratoriais para o cultivo de microrganismos anaeróbios estritos, despertou interesse nos pesquisadores na participação desses microrganismos em infecções de origem endodôntica, revelando novos métodos para o cultivo das espécies (Aranki & Freter, 1972; Fulghum *et al.*, 1973; Crawford *et al.*, 1974).

Bergenholtz (1974) investigaram a ocorrência de bactérias em 84 dentes uniradulares traumáticamente desvitalizados com câmara pulpar intacta. Verificou que 64% das amostras apresentaram cultura positiva. Relatou que a microbiota dos canais radiculares era do tipo mista, com média de 4,3 espécies isoladas por canal radicular, formada em 78% (n=171) por microrganismos anaeróbios estritos, pertencentes aos gêneros *Bacteroides* (n=62), *Peptostreptococcus* (n=27), *Fusobacterium* (n=26) e *Corynebacterium* (n=45).

Até que em 1976, Sundqvist realizou um estudo que representou um marco na literatura endodôntica, tendo em vista o fato de que seus achados revolucionaram os conceitos até então vigentes. Ao analisar microbiologicamente 32 canais radiculares de dentes uniradulares com coroas hígidas e polpas necrosadas em decorrência de trauma, constatou que 90% das cepas bacterianas isoladas eram anaeróbias estritas. A ocorrência de

tais espécies variou entre 24% (Brown & Rudolph, 1957) e 64% (Keudell *et al.*, 1976) em estudos anteriores.

Sundqvist *et al.*, em 1979, investigaram combinações bacterianas isoladas de canais necróticos sintomáticos e assintomáticos, inoculando em tecido subcutâneo de cobaias. Os autores concluíram que apenas os casos sintomáticos foram capazes de desenvolver infecções transmissíveis, verificando a presença de *Bacteroides* spp. em todas as amostras; verificaram ainda que cepas de *Peptostreptococcus micros* ou *Streptococcus mitis* foram essenciais para desenvolvimento da patogenicidade.

Já em 1981, Grossman questionou o significado dos anaeróbios estritos no tratamento endodôntico, já que essas bactérias em contato com o ar, instrumentos e agentes químicos eram rapidamente destruídas. Tal questionamento veio a tona, por desconhecimento do real papel das bactérias anaeróbias estritas, principalmente Gram-negativas, no desenvolvimento das doenças pulpares e periapicais.

Möller *et al.* (1981) com o objetivo de confirmar o papel exercido pelos microrganismos na etiopatogenia das lesões perirradiculares, induziram de forma asséptica e séptica, necrose em dentes de macacos após 6 e 7 meses. As análises clínica, radiográfica, microbiológica e histológica evidenciaram nos casos de polpas necrosadas - não infectadas, os tecidos perirradiculares estavam desprovidos de inflamação e indícios de reparação, enquanto que nos dentes com polpa infectada, houve sempre o desenvolvimento de lesões perirradiculares.

Os achados de Sundqvist (1976) e Möller *et al.* (1981) mais tarde foram confirmados por Byström & Sundqvist (1983) e Baumgartner & Frankler (1991), através da constatação da prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados nos 5mm apicais.

Uma vez estabelecido o conceito de que os microrganismos exercem um papel-chave no desenvolvimento das patologias pulpares e perirradiculares e, com o avanço no surgimento de novas técnicas para identificação de microrganismos anaeróbios estritos, diversos estudos procederam a fim de determinar o perfil da microbiota e a prevalência de espécies bacterianas nas diferentes infecções de origem endodôntica.

Yoshida *et al.* (1987) analisaram microbiologicamente 36 canais radiculares de dentes permanentes com presença de lesão periapical. Dos 11 dentes que apresentavam dor espontânea, dor à percussão e presença de exsudato, houve um predomínio em mais de 79% de bactérias anaeróbias estritas, representadas em sua maioria por *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp., e *Peptostreptococcus* spp., principalmente por “*Peptococcus magnus*”. As espécies facultativas “*S. faecalis*” e “*S. intermedius*” foram isolados em 3 casos; espécies bacterianas anaeróbias como “*P. magnus*”, *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Actinomyces* spp. e *Bacteroides* spp., assim como facultativas “*S. MG-intermedius*”, “*S. constellatus*”, “*S. faecalis*” e bactérias entéricas: *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp. foram isoladas de amostras coletadas de canais radiculares de 13 dentes com dor à percussão e ausência de dor espontânea. Já no grupo controle, de 12 dentes analisados, os quais não apresentavam dor à percussão, dor espontânea e exsudato, apenas 7 (58,3%) apresentaram culturas positivas, representados em sua maioria por microrganismos facultativos, tais como *Streptococcus* do grupo D e enterobactérias. Os autores concluíram que a identificação de diversas espécies bacterianas anaeróbias estritas nos canais radiculares está relacionada com a presença de sintomatologia e, espécies como *B. melaninogenicus* e *P. magnus* podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de sintomas clínicos.

Haapasalo (1989) investigou a ocorrência, o papel e a taxonomia dos *Bacteroides* spp. em 62 canais radiculares de dentes infectados. Observou que todas as infecções exceto uma, mostraram ser infecções do tipo mistas dominadas por microrganismos anaeróbios estritos.

Sundqvist *et al.* (1989) analisaram a microbiota de canais radiculares de 72 dentes com presença de lesão perirradicular. Observaram que 22 dentes apresentavam uma ou mais espécies por canal radicular. Dos 72 dentes avaliados, 22 apresentaram pelo menos uma espécie de BPPN (Bacilos produtores de pigmentos negros); espécies anaeróbias estritas representaram 95,4% dos microrganismos isolados.

Kobayashi *et al.* (1990) analisaram a microbiota endodôntica de 15 canais radiculares de dentes com periodontite avançada. Os autores constataram predomínio de espécies anaeróbias estritas tanto no canal radicular quanto na bolsa periodontal. *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp. foram

as espécies anaeróbias mais freqüentemente identificadas; *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp. foram as espécies anaeróbias facultativas mais freqüentemente identificados nas bolsas periodontais.

Baumgartner e Falkler (1991) isolaram e identificaram através de testes bioquímicos 50 espécies bacterianas, representadas em 68% (n=34) por anaeróbias estritas nos 5 milímetros apicais de 10 canais radiculares em dentes recém-extraídos com exposição pulpar por lesão cariiosa e presença de lesão perirradicular. Entre as espécies bacterianas identificadas foram encontradas: *A. israelii* (n=1), *A. viscosus* (n=1), *A. naeslundii* (n=2), *Lactobacillus* spp., “*B intermedius*” (n=5), “*B. denticola*” (n=1), *P. anaerobius* (n=5), *P. micros* (n=1), *Veillonella parvula* (n=5), “*Bacteroides buccae*” (n=5), *E. faecalis* (n=4), *F. nucleatum* (n=3) e *S. mutans* (n=3).

Van Winkelhoff *et al.* (1992) reportaram sobre o papel da *Porphyromonas endodontalis* nas infecções endodônticas. *P. endodontalis* apresenta uma baixa virulência em mono-infecção experimental, porém exerce um papel importante em infecções anaeróbias mistas. BPPN, incluindo *P. endodontalis* possuem um elevado potencial de degradar proteínas séricas e tornar peptídeos e aminoácidos disponíveis para metabolismo de microrganismos como, por exemplo, *P. micros*.

Sundqvist (1994) revisou as espécies mais freqüentemente isoladas em canais radiculares fechados, descrita anteriormente em seu trabalho de 1976, apresentando as devidas atualizações de taxonomia. Houve um predomínio de anaeróbios estritos em relação as espécies anaeróbias facultativas. *F. nucleatum* (48%), *Streptococcus* spp. (40%), *Bacteroides* spp. (35%), *P. micros* (34%), *P. intermedia* (34%), *Lactobacillus* spp. (32%), *P. anaerobius* (31%), *E. alactolyticum* (34%), *E. lentum* (31%). *Porphyromonas* spp. (9%) e *Actinomyces israelii* (11%) foram isolados nos respectivos percentuais. Bactérias como *Pseudomonas aureginosa* foram raramente encontradas no canal infectado, a não ser que fossem levadas pela instrumentação.

Gomes *et al.* (1994) analisaram microbiologicamente 30 canais radiculares, 14 apresentavam dor espontânea, 20 dor à percussão, 23 canais úmidos e 7 casos de edema. Cinquenta e sete diferentes espécies foram identificadas em 27 canais radiculares. Espécies anaeróbias estritas representaram 60% do total de espécies identificadas. Entre as espécies

anaeróbias identificadas, as mais freqüentes foram: *P. micros* (16,7%), *P. melaninogenica* (6,9%), *F. nucleatum* (6,9%) e *P. intermedia* (5,5%). Espécies anaeróbias estritas foram isoladas em 96 % nos dentes sintomáticos e 53% nos dentes assintomáticos. *Prevotella* spp. foi isolada em 64,2% dos canais com dor e 12,5% sem dor, próximo da espécie de *Peptostreptococcus* spp. encontrada em 71,4% e 31,3% nos dentes sintomáticos e assintomáticos respectivamente. Possível associação entre a presença de *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus* spp. foi sugerida pelos autores.

Em 1995, Gomes reportou que apesar de mais de 300 espécies terem sido reconhecidas até o momento como habitantes da cavidade bucal, apenas um grupo restrito de espécies, com cerca de 56 gêneros bacterianos, são capazes de colonizar o canal radicular, incluindo espécies do gênero *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp. e *Lactobacillus* spp.

Gomes *et al.* (1996a) analisaram coletas microbiológicas de 70 canais radiculares para determinar se algum sinal ou sintoma endodôntico possuía relação com a presença de determinada espécie bacteriana. Trinta e sete casos que apresentavam dor estavam associados à presença das espécies de *Prevotella* spp. ou *Peptostreptococcus* spp.; 49 dentes que apresentaram dor à percussão estavam associados à presença de *Prevotella* spp. ou anaeróbios; 23 dentes que apresentaram edema estavam associados à presença de *Eubacterium* spp., *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus micros*; 6 dentes que possuíam exsudato purulento estavam associados à presença de *F. necrophorum*, *P. loescheii*, *S. constellatus* e *Bacteroides* spp.; 57 canais “molhados”, ou seja, com presença de exsudato, estavam associados à microrganismos anaeróbios facultativos predominantemente e, à alguma espécie pertencente aos gêneros: *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp. ou *Porpionibacterium* spp..

Lana *et al.* (2001) estudaram a microbiota de canais radiculares de 31 dentes unirradiculares com necrose pulpar, sendo 22 com a coroa intacta e 9 com comunicação direta com a cavidade bucal. Um total de 308 microrganismos foi isolado de 27/31 (87.1%) canais radiculares, dos quais foram identificados 278 (90.3%) espécies/gêneros. O número de microrganismos isolados em cada canal radicular variou entre 1 e 11, representado por uma média de 5 espécies por canal. Dos 27 canais radiculares, 22 (81.5%) apresentaram

infecção do tipo polimicrobiana. Bactérias anaeróbias estritas, microaerófilas e fungos foram isolados em 24 (88.9%), 14 (51.8%) e 5 (18,5%) respectivamente das amostras clínicas. Os gêneros mais freqüentemente isolados foram *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., e *Peptostreptococcus* spp.. Uma forte associação entre *Clostridium* spp. e *Prevotella* spp. e entre *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp. foram detectadas. Entretanto, não houve associação significativa entre a presença de *Prevotella* spp. e *Fusobacterium* spp. com *Clostridium* spp. e *Peptostreptococcus* spp. O gênero *Streptococcus* foi freqüentemente associado à presença de *Prevotella* spp. e *Fusobacterium* spp.

Villanueva (2002) estudou a microbiota de 28 canais radiculares de pacientes que procuraram tratamento de urgência após o início da terapia endodôntica. *F. nucleatum* pareceu estar relacionado às formas mais severas de reagudecimento entre sessões do tratamento endodôntico.

Peters *et al.* (2002) investigaram combinações de espécies bacterianas em 58 amostras obtidas de canais radiculares de dentes com infecção endodôntica e lesão periapical sem sinais e sintomas. Das espécies isoladas, 87% eram anaeróbias estritas; o número de espécies anaeróbias estritas variou entre 4 e 7 por canal radicular, obtendo a média de 5,1 espécies, sendo as mais prevalentes: *P. intermedia*, *P. micros* e *A. odontolyticus*, as quais estavam presentes em 33% (n=19), 29% (n=17) e 19% (n=11) respectivamente. Dentre as combinações testadas, foi possível estabelecer uma correlação positiva (Odds ratio >2) entre *P. intermedia* e *P. oralis*, *P. intermedia* e *P. micros*, *A. odontolyticus* e *P. micros*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp.

Sousa *et al.* (2003) analisaram a microbiota de canais radiculares de dentes com abscesso periapical. Foram coletadas 30 amostras. Um total de 117 microrganismos foi isolado, representados por 75% de anaeróbios estritos. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *P. prevotti* 43.3% (n=13), *P. micros* 30% (n=9), *F. necrophorum* 23.3% (n=7), *S. constellatus* 20% (n=6) e *P.intermedia/ nigrescens* 10% (n=3). Os autores concluíram que bactérias anaeróbias Gram-positivas predominam nas infecções mistas.

Jacinto *et al.* (2003) analisaram a microbiota de 70 amostras coletadas de canais radiculares de dentes com abscessos periapicais (69 culturas positivas). Foram isoladas 352 cepas pertencendo a 69 diferentes espécies; 83% dos microrganismos isolados eram anaeróbios estritos e 47,5% Gram-negativos. Um máximo de 9 espécies foram isoladas por canal radicular. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *F. necrophorum*, *P. prevotti*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *P. intermedia/nigrescens*, *G. morbillorum* e *Veillonella* spp.

Gomes *et al.* (2004) investigaram a microbiota de 60 canais radiculares sendo 41 com necrose pulpar (infecção primária) e 19 com insucesso da terapia endodôntica (infecção secundária). Um total de 224 microrganismos foram isolados pertencentes a 56 diferentes espécies. Um máximo de 10 espécies foi identificado por canal. Das bactérias isoladas, 70% foram anaeróbias estritas/ microaerófilas. Dentre as anaeróbias estritas, as mais freqüentemente isoladas foram: *P. micros* (35%), *F. necrophorum* (23.3%), *F. nucleatum* (11.7%), *P. intermedia/nigrescens* (16,7%), *P. gingivalis* (6.7%) e *P. endodontalis* (5%). Associações significantes foram encontradas entre microrganismos anaeróbios estritos, especialmente, Gram-negativos e presença de dor, histórico de dor, dor à percussão e presença de exsudato. Em particular, a) Dor (n=29) e *P. micros*, *P. intermedia/nigrescens* e *Eubacterium* spp.; b) Histórico de dor (n=31) e *P. micros*, *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp.; c) Dor à percussão (n=29) e *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp.; d) Edema e *Peptostreptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Enterococcus* spp.; e) Canais úmidos (n=33) e *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp.; f) Exsudato purulento (n=20) e *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. Estes achados sugerem uma complexidade no potencial de interação entre as espécies decorrendo em quadros clínicos característicos; indicando também que a microbiota das infecções endodônticas primárias com presença de lesão periapical difere das espécies isoladas em infecções secundárias utilizando técnicas de cultura.

Chu *et al.* (2005) identificaram microrganismos em dentes com infecção endodôntica primária com/ sem exposição pulpar. Foram avaliados 45 canais com polpas expostas e 43 sem exposição. Dos canais com câmara exposta foram identificados um total

de 211 microrganismos representados em 68.9% de anaeróbios estritos, pertencendo a 28 diferentes gêneros e 55 espécies; em média 4,6 espécies foram isoladas por canal radicular (variando entre 1 e 10 espécies). Os 4 gêneros mais frequentemente isolados foram *Prevotella* spp. (51/211), *Peptostreptococcus* spp. (29/211), *Actinomyces* spp. (20/211) e *Campylobacter* spp. (14/211). Nos canais sem exposição, um total de 185 microrganismos foi identificado, representados por 68.5% de microrganismos anaeróbios estritos. Cinquenta e quatro espécies bacterianas pertencentes a 28 gêneros foram identificadas. A média de espécies bacterianas isoladas por canal foi de 4,2 (variando entre 0 e 7 espécies). *Prevotella* spp. (30/185), *Actinomyces* spp. (21/185), *Campylobacter* spp. (19/185) e *Peptostreptococcus* spp. (21/185) foram os gêneros mais frequentemente isolados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência dos gêneros mais frequentemente isolados nos dentes com/sem exposição pulpar, exceto pelo gênero *Prevotella* spp., o qual foi mais comumente isolado nos dentes com exposição pulpar. A similaridade entre as espécies bacterianas isoladas nos dentes com/ sem exposição pulpar, sugere a não relevância deste dado, na determinação do tipo de bactérias presentes na infecção dos canais radiculares.

Os estudos realizados demonstram que as infecções endodônticas primárias são do tipo mistas e polimicrobianas, com predominância de microrganismos anaeróbios estritos, apresentando complexa interação microbiana entre as espécies.

Apesar de um grande número de espécies bacterianas terem sido isoladas da cavidade bucal, apenas um pequeno número limitado têm sido identificado nas infecções endodônticas através do método de cultura. Vale ressaltar que 50% da microflora endodôntica não é cultivável, e por consequência deste fato, esta encontra-se subestimada, principalmente quanto à presença de espécies anaeróbias estritas. Surge então, uma nova era para o diagnóstico em microbiologia, empregando métodos moleculares de detecção microbiana.

MÉTODOS MOLECULARES

Com o advento das técnicas moleculares, mais e mais pesquisas buscam usufruir seus benefícios, uma vez que estas irão propiciar maior sensibilidade e confiabilidade nas respostas de seus testes.

Bogen & Slots (1999) utilizaram primers específicos para detectar a presença de *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em 20 dentes fechados com lesões periapicais associados à infecções endodônticas persistentes (sintomáticos e assintomáticos) através do método de reação de polimerase em cadeia (PCR). *P. endodontalis*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* não foram detectadas em nenhuma das lesões periapicais estudadas; a baixa ocorrência de BPPN em lesões periapicais de dentes fechados pode explicar a estabilidade relativa da doença.

Oliveira *et al.* (2000) avaliando a ocorrência de *P. endodontalis* através do método 16s rRNA-PCR em 44 dentes com presença de lesão cariada, necrose pulpar e destruição óssea perirradicular (com exceção de 2 dentes), detectaram a presença da espécie em 39,5% do total de casos analisados (17/43); sendo detectada em 25% dos casos assintomáticos com presença de lesão periapical (n=6), em 52,6% nos dentes que apresentavam dor à percussão (n=10) e em apenas 1 caso assintomático sem presença de lesão perirradicular. Os autores concluíram que a espécie *P. endodontalis* pode estar presente tanto nos casos de dentes sintomáticos quanto nos assintomáticos.

Jung *et al.* (2000) investigaram microrganismos em 38 canais radiculares (18 sintomáticos e 20 assintomáticos) através de PCR “Dot-Blot hybridization”. Das espécies analisadas, as mais frequentemente detectadas foram *Fusobacterium* spp. (68,4%), *Peptostreptococcus micros* (44,7%) e *P. gingivalis* (26,3%). BPPN foram encontrados em 42,1% dos dentes. Associações significantes foram encontradas entre nas combinações de *B. forsythus*/*P. gingivalis* e *P. gingivalis*/*Treponema* spp. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre bactérias e sintomas clínicos.

Xia *et al.* (2000) utilizaram PCR (16 rDNA) com primers específicos para *Prevotella tanneri* com objetivo de examinar 118 amostras provenientes de infecções endodônticas. *P. tanneri* foi detectada em 60% das amostras. Resultados sugerem que *P.*

tannerae pode ser comumente encontrado em infecções endodônticas, podendo ser um potencial patógeno nas infecções endodônticas.

Siqueira Jr. *et al.* (2001) utilizaram PCR (16S rDNA) para investigar a ocorrência de *Treponema denticola* em amostras coletadas de 54 canais radiculares de dentes unirradiculares com lesão cariada e presença de necrose pulpar. *T. denticola* foi detectada em 10 dos 29 casos assintomáticos (34,5%), 8 de 15 casos com dor à percussão (53,3%) e 5 de 10 casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo (50%). No geral, *T. denticola* foi detectado em 23 dos 54 casos analisados (42,6%). Os achados sugerem o envolvimento de *T. denticola* na patogênese das lesões perirradiculares de origem endodôntica.

Jung *et al.* (2001) identificaram espiroquetas orais e suas associações com outras bactérias em 79 dentes com presença de lesão periapical utilizando o método PCR (16S rRNA). *P. gingivalis* (27,4%), *Treponema maltophilum* (26%), *Bacteroides forsythus* (15%) e *Treponema socranskii* (2,7%) foram isolados nos respectivos percentuais. Outros treponemas, incluindo a espécie *T. denticola*, não foram detectados nas amostras analisadas. Associações microbianas significativas foram identificadas entre as espécies de *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*. Os autores sugerem que a espécie *T. maltophilum* deva ser incluída em estudos etiológicos de infecções endodônticas.

Hashimura *et al.* (2001) coletaram 36 amostras de canais radiculares (7 dentes com pulpite irreversível, 12 casos de retratamento e 17 dentes indicados para tratamento endodôntico) com o objetivo de detectar a presença das espécies *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* e *Eubacterium saphenum* utilizando a metodologia 16S rRNA-PCR. *S. exigua* e *M. timidum* foram detectados em 29% das amostras coletadas em dentes com pulpite irreversível (2/7); *S. exigua* e *M. timidum* foram detectados em 25% e *E. saphenum* em 17% dos 12 casos indicados para retratamento endodôntico; *S. exigua*, *M. timidum* e *E. saphenum* foram detectados nos respectivos percentuais 41%, 24% e 71% nos 17 dentes indicados para tratamento endodôntico. Os autores concluíram que pelo fato das espécies *S. exigua*, *M. timidum* e *E. saphenum* estarem presentes nos canais radiculares, podem estar associadas à patologias pulpares e perirradiculares.

Siqueira Jr. *et al.* (2002b), determinaram a prevalência das espécies de *Actinomyces* spp., *Streptococcus* spp. e *E. faecalis* em 53 canais radiculares de dentes com lesão cariiosa, necrose pulpar e presença de lesão perirradicular (26 casos assintomáticos e 27 abscessos periapicais agudos) utilizando “Checkerboard DNA-DNA hybridization”. Tal metodologia permitiu a detecção de *Streptococcus* spp. em 22,6%, *Actinomyces* spp. em 9,4% e *E. faecalis* em 75% das amostras coletadas. As espécies *S. intermedius* (11,5%), *E. faecalis* (11,5%) e *S. anginosus* (7,7%) foram as mais frequentes nos casos assintomáticos. Já nos casos de abscesso, as espécies mais frequentemente encontradas foram *A. gerencicseriae* (14,8%), *S. gordonii* (11,1%), *S. intermedius* (11,1%), *A. israelii* (7,4%), *S. anginosus* (7,4%) e *S. sanguis* (7,4%). Das espécies detectadas, *S. constellatus* foi a única espécie que apresentou associação positiva ao quadro de abscesso perirradicular agudo.

Siqueira Jr. & Rôças (2003a), utilizaram a metodologia de PCR (16rDNA) para realizar diversos estudos a fim de correlacionar novas espécies bacterianas, até então não identificadas nas infecções endodônticas primárias pelo método de cultura. Os autores, demonstraram em seus resultados que as espécies *Filifactor alocis*, *Treponema maltophilum*, *Treponema lecithinolyticum*, *Treponema socranskii*, *Propionibacterium propionicus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Bacteroides forsythus* estavam relacionadas às diferentes formas das infecções endodônticas primárias, considerando-os como potenciais patógenos endodontais. Seguem abaixo, os estudos realizados detalhadamente.

Siqueira Jr. & Rôças (2003b) avaliaram a ocorrência de *Filifactor alocis* em 50 amostras coletadas de canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária através de PCR, analisando a região 16S rDNA. *F. alocis* foi detectado em 57,1% (12/21) das amostras coletadas de canais radiculares assintomáticos com presença de lesão perirradicular, 30% (3/10) dos casos de periodontite apical aguda e em 42,1% (8/19) nas amostras de conteúdo purulento aspirado de dentes abscedados. De uma forma geral, foi detectado em 23/50 (46%) das amostras coletadas de dentes com infecção endodôntica. Estes achados sugerem o envolvimento de *F. alocis* na etiologia de diferentes formas de doenças perirradiculares.

Siqueira Jr. & Rôças (2003c) avaliaram a presença de *Treponema maltophilum*, *Treponema amylovorum*, *Treponema medium* e *Treponema lecithinolyticum* em canais

radiculares com infecções endodônticas primárias. Foram avaliadas 32 amostras utilizando nested PCR. Os resultados mostraram que todos os casos foram positivos para os microrganismos testados. Os mais freqüentemente encontrados em ordem decrescente foram: *T. maltophilum* (39%), *T. lecithinolyticum* (26%), *T. medium* (13%) e *T. amylovorum* (7%). Os autores concluíram que espécies de treponema, em especial *T. maltophilum* e *T. lecithinolyticum* fazem parte da patogenicidade das doenças perirradiculares.

Siqueira Jr. & Rôças (2003d) avaliaram através do método 16S rDNA (PCR) a presença de *P. propionicus* e *A. radidentis* em 62 amostras coletadas de canais radiculares; sendo 21 dentes com necrose pulpar e presença de lesão perirradicular assintomáticos, 10 dentes com abscesso perirradicular agudo, 12 de dentes tratados endodônticamente com presença de lesão perirradicular indicados para retratamento. *P. propionicus* e *A. radidentis* foram detectados em 29% (6/21) e 5% (1/21) das amostras coletadas de canais radiculares em dentes assintomáticos com presença de lesão perirradicular; 50% (5/10) e 10 % (1/10) dos casos de abscesso perirradicular agudo respectivamente. 37% (7/19) do conteúdo purulento aspirado dos canais com abscesso perirradicular agudo foram positivos para *P. propionicus*. De todas as amostras coletadas de canais radiculares com infecção endodôntica primária *P. propionicus* e *A. radidentis* foram detectados em 36% (18/50) e 4% (2/50) respectivamente; e em apenas 1 dos 12 dentes com insucesso da terapia endodôntica (8%). Os autores concluíram que *P. propionicus* foi encontrado em números relativamente altos em pacientes com infecção endodôntica primária e persistente, podendo sugerir a sua participação como endodonto-patógenos associados a diferentes formas de doenças perirradiculares. Em contraste, *A. radidentis* foi encontrado, ocasionalmente, em determinados pacientes, e sua participação nas infecções endodônticas ainda permanece desconhecida.

Siqueira Jr. & Rôças (2003e) verificaram através do nested PCR a presença de *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus* em infecções endodônticas primárias. Foram avaliados 57 dentes unirradiculares com lesões periapicais, necrose pulpar e evidência de lesão periapical, sendo 28 casos assintomáticos, 12 com periodontite apical aguda e 23 com abscesso periapical. *C. gracilis* e *C. rectus* foram detectados em 21,45% e

30%, respectivamente, nos dentes com periodontite apical crônica. Nos casos de periodontite apical aguda, *C. gracilis* e *C. rectus* foram detectados em 23,5% e 11,8% dos casos. No geral, *C. gracilis* foi detectado em 21,3% e *C. rectus* em 23,3% de todos os casos. Os autores concluíram que esses microrganismos participam das infecções endodônticas e sugerem sua possível participação nas doenças perirradiculares.

Siqueira Jr. & Rôças (2003f) investigaram a presença de *Treponema socranskii* em 60 amostras de canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária através de nested PCR. A espécie foi detectada em 43 das 60 amostras investigadas. *T. socranskii* foi detectada em 39,3% (11/28) dos casos assintomáticos, 41,7% (5/12) dos casos de periodontite apical aguda e 25% (5/20) casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo. Os autores concluíram que essa espécie pode estar envolvida nas diversas formas de lesões perirradiculares.

Siqueira Jr. & Rôças (2003g) analisaram a presença de *Pseudoramibacter alactolyticus* em 50 amostras coletadas de canais radiculares de dentes com lesão cariada, necrose pulpar e presença de lesão periapical através de nested PCR. *P. alactolyticus* foi detectado em 76% dos 21 casos assintomáticos, 60% dos 10 casos com periodontite apical aguda e em 32% das 19 amostras de conteúdo purulento de abscessos perirradiculares agudos.

Siqueira Jr. & Rôças (2003h) utilizaram a metodologia de nested PCR com o objetivo de investigar a prevalência de *Bacteroides forsythus* em 50 canais radiculares de dentes com lesão cariada, necrose pulpar e presença de lesão periapical. *B. forsythus* foi detectado em 13 dos 22 casos assintomáticos (59,1%), em 4 dos 10 casos com periodontite apical aguda (40%) e em 9 de 18 casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo (50%). No geral, a espécie bacteriana foi detectada em 26 das 50 amostras coletadas dos canais radiculares (52%). Os achados deste trabalho suportam o fato, desta espécie bacteriana estar associada a infecções de origem endodônticas, podendo estar envolvida na patogênese de diferentes formas de lesões perirradiculares.

Siqueira & Rôças (2003i) investigaram associação positiva e negativa envolvendo *Dialister pneumosintes* nas infecções endodônticas primárias utilizando o método de PCR (16S rDNA- gene) em 50 amostras coletadas de canais radiculares (abscesso perirradicular

agudo (n=18), dentes assintomáticos com presença de lesão periapical (n=22) e 10 dentes com periodontite apical aguda). *D. pneumosintes* foi detectado em todos os casos analisados; sendo possível estabelecer correlação positiva entre *D. pneumosintes* e *T. denticola*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *T. pectinovorum* e *T. vicentii*. Associação negativa entre *D. pneumosintes* e *B. forsythus*, *P. gingivalis*, e *A. israelii* foi encontrada. Os achados sugerem uma considerável participação de *D. pneumosintes* como um importante endodonto-patógeno, geralmente associado à infecções mistas.

Rôças *et al.* (2003) avaliaram através de nested PCR a presença de treponemas orais em 32 amostras coletadas de canais radiculares em infecções endodônticas primárias. Os resultados demonstram que *T. denticola* estava presente em 78,1% (25/32) dos casos, *T. socranskii* em 40,6% (13/32), *T. vicentii* em 15,6% (5/32) e *T. pectinovorum* em 9,4% (3/32) das amostras avaliadas. Pelo menos uma das quatro espécies de treponema foi encontrada em 84,4% dos casos avaliados. Os autores concluíram que as espécies de espiroquetas estão envolvidas em outras doenças orais e deveriam ser incluídas como endodonto-patógenos.

Siqueira Jr. *et al.* (2003) verificaram a presença de *Peptostreptococcus micros* em infecções endodônticas primárias através de PCR (16S rDNA). Foram coletadas amostras de 50 canais radiculares com lesões de cárie, polpas necrosadas e diferentes formas de doenças perirradiculares. No geral, *P. micros* foi encontrado em 28% dos casos (14/50); dentre estes, 6 apresentavam periodontite apical crônica (6/22). Os autores sugerem o envolvimento da espécie nas diversas formas de periodontite apical.

Siqueira Jr. & Rôças (2004a) investigaram através de nested PCR a presença de *Centipeda periodontii*, uma espécie ainda não detectada pelo método de cultura em 50 amostras coletadas de dentes com infecção endodôntica primária (23 dentes assintomáticos, 7 dentes com periodontite apical aguda e 20 dentes com abscesso periapical). *C. periodontii* foi detectada em 14% das amostras analisadas, 13% casos assintomáticos, 14% casos com periodontite apical aguda e 15% casos de abscesso. Os autores concluíram que há necessidade de esclarecimento do papel dessa espécie nas infecções endodônticas.

Siqueira Jr. & Rôças (2004b) estudaram a participação das espécies *F. alocis* e *D. pneumosintes*, através da técnica de multiplex PCR para análise da região 16S rDNA. *D.*

pneumosintes foi detectado em 11 amostras coletadas de dentes assintomáticos e dentes associados à presença de abscesso (7 assintomáticos e 4 abscessos). *F. alocis* foi detectado em 9 casos (6 assintomáticos e 3 abscessos); ambas espécies foram detectadas concomitantemente em 6 amostras (3 assintomáticas e 3 abscessos). Os resultados obtidos confirmam que *F. alocis* e *D. pneumosintes* são comumente isolados em infecção endodôntica primária e podem participar como patógenos das lesões perirradiculares.

Siqueira Jr. *et al.* (2004a) analisaram 23 dentes extraídos com exposição pulpar por lesão cariada e com presença de lesão perirradicular utilizando nested PCR, para investigar 11 espécies de endodonto-patógenos presentes no terço apical. *Pseudoramibacter alactolyticus* foi detectada em 44% dos casos avaliados (n=10); *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum* em 26% (n=6); *Porphyromonas endodontalis* em 17% (n=4), *Filifactor alocis* em 9% (n=2); *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis* em 4% (n=1). Nenhuma das amostras avaliadas foi positiva para *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* ou *Campylobacter rectus*. A ocorrência destas espécies no terço apical dos dentes com infecção endodôntica sugere o envolvimento destes microrganismos na patogênese das lesões perirradiculares.

Siqueira Jr. *et al.* (2004b) estudando as comunidades bacterianas associadas com infecções endodônticas primárias sintomáticas (n=11) e assintomáticas (n=12), compararam os padrões de “fingerprinting” no gel de eletroforese (DGGE) das duas condições clínicas. A análise comparativa revelou que as bandas eram comuns nos casos sintomáticos e assintomáticos, e a maioria das DGGE bandas aparentou ser única para cada situação clínica. Quatro bandas intensas observadas no gel mostraram-se seqüencialmente similares para os gêneros de *Campylobacter* spp. (5/12 assintomático e 3/11 sintomáticos), *Fusobacterium* spp. (4/11 sintomáticos), *Actinobacter* spp. (5/12 assintomáticos) e família das enterobactérias (11/12 assintomáticos e 2/11 sintomáticos). Os resultados confirmam que a infecção endodôntica é do tipo polimicrobiana e que existem diferenças significantes na predominância de espécies bacterianas entre os casos assintomáticos e sintomáticos.

Rôças & Siqueira Jr. (2005b) detectaram a presença de novas espécies orais e novos filotipos orais em amostras coletadas de 29 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical através de PCR (16S rRNA-gene based nested ou

hemi-nested PCR). *Olsenella uli*, *Granulicatella adiacens* e clones sinérgicos BA121 e E3_33 foram investigadas. Os resultados revelaram que novos filotipos e novas espécies podem fazer parte da microbiota associada a infecções endodônticas sintomáticas.

Rôças & Siqueira Jr. (2005a) investigaram a ocorrência de duas novas espécies ainda não identificadas pelo método de cultura nas infecções endodônticas. *Olsenella uli* e *Olsenella profusa* foram investigadas em 30 amostras coletadas de 15 canais radiculares de dentes assintomáticos com presença de lesão perirradicular e, 15 abscessos perirradiculares agudos utilizando 16S RNA- nested PCR. *Olsenella uli* foi detectada em 27% dos dentes com lesão perirradicular e 20% de amostras de pus coletadas de lesões sintomáticas (abscessos). *Olsenella profusa* foi detectada em 7% e 13% dos dentes sintomáticos e assintomáticos respectivamente. Um novo tipo de filo também foi detectado. Os autores concluíram que espécies de *Olsenella* podem fazer parte da microbiota associada às infecções endodônticas de canais radiculares em dentes humanos, desempenhando um papel na patogênese de doenças perirradiculares.

Foschi *et al.* (2005) utilizaram a metodologia de PCR com primers específicos para *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* com o objetivo de examinar amostras provenientes de 62 canais radiculares de 22 dentes com periodontite apical aguda, 15 dentes com periodontite apical crônica e 25 dentes com periodontite apical exacerbada. As espécies de *T. denticola* e *E. faecalis* foram detectadas em 24% dos casos, seguidas *P. gingivalis* (13%), *P. intermedia* (8%) e *T. forsythensis* (7%). *T. denticola* foi detectada em 56% dos dentes com periodontite apical aguda, *E. faecalis* em 60% dos casos com periodontite apical crônica e em 72% dos dentes com periodontite apical exacerbada. Os autores sugeriram que tais espécies desempenham um papel crítico nas patologias de origem endodônticas.

Rôças & Siqueira Jr. (2005c) ainda investigando espécies de treponemas (*T. parvum*, *T. putidum*) em amostras coletadas de infecção endodôntica primária através nested PCR, obtiveram os seguintes resultados: *T. parvum* estava presente em 26% das infecções primárias, sendo 52% das amostras de periodontite apical crônica, 20% nos casos de periodontite apical aguda e ausente nos casos de abscesso. *T. putidum* foi encontrado em

apenas um caso de periodontite apical aguda. Os autores concluíram que esses microrganismos fazem parte das infecções endodôntica.

Siqueira & Rôças (2005) investigaram novos filos e novas espécies associadas às infecções endodônticas. Vinte e uma amostras de dentes com necrose pulpar e 22 com infecções persistentes foram analisadas utilizando primers da região 16S rRNA e “heminested PCR”. Os resultados mostraram que as espécies mais frequentemente encontradas foram *Dialister invisus* (81%), *Synergistes oral* clone BA 121 (33%) e *Olsonella uli* (33%). A detecção desses novos microrganismos em canais radiculares infectados sugere a possível participação dos mesmos na patogenicidade das doenças perirradiculares.

de Souza *et al.* (2005) analisaram a microbiota de 12 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão perirradicular pela técnica de “checkerboard DNA – DNA hybridization”. As amostras foram coletadas antes do preparo químico-mecânico dos canais radiculares e 14 dias após a terapia medicamentosa com hidróxido de cálcio. Das espécies analisadas, as mais prevalentes foram: *F. nucleatum*, *S. vicentii*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *S. constellatus*, *V. parvula*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica*, e *S. sanguis*. Após intervenção endodôntica houve uma diminuição no número das espécies *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *C. gingivalis*, *C. ochraceae*, *P. gingivalis*, *S. noxia*, *S. sanguis*, e *S. oralis*. Aumento no número das espécies de *A. actinomycetemcomitans*, *C. sputigena* e *E. corrodens* pode ser observado após a terapia endodôntica com hidróxido de cálcio. Estes resultados indicam que a terapia endodôntica convencional com hidróxido de cálcio resulta em diminuição do número de espécies patogênicas envolvidas na necrose pulpar, entretanto, seu uso é limitado, devido ao seu espectro de ação limitado.

Saito *et al.* (2006) identificaram bactérias em 7 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical através de análise seqüencial de 16S rDNA-PCR. Todas as amostras foram positivas para bactérias. A maioria dos taxa (65,2%) pertenciam ao filo firmicutes de bactérias Gram-positivas, seguidos de Proteobacteria (10,9%), Spirochaetes (4,3%), Bacteroidetes (6,5%), Actinobacteria (2,2%) e Deferribacteres (2,2%). Um total de 46 unidades taxonomicas foi identificado. Quatro clones com baixa similaridade seqüencial previamente depositado no banco de dados foram

seqüenciados e classificados taxonomicamente como novos representantes dos Clostridiales, incluindo nova espécie de *Mogibacterium*. A identificação de novos tipos de filós associados à infecção endodôntica sugere que o endodonto abriga uma proporção relevante de taxa não caracterizados.

Rôças *et al.* (2006) avaliaram através de nested PCR a prevalência de 10 espécies de endodonto-patógenos não cultiváveis de 37 e 40 amostras coletadas de abscessos apicais agudos de duas regiões geograficamente distintas Brasil/ EUA (Portland). Das amostras coletadas no Brasil, as espécies mais freqüentemente detectadas foram: *Treponema denticola* (73%), *Porphyromonas endodontalis* (70%) e *Tanarella forsythia* (57%); diferente das amostras coletadas em Portland, *Dialister invisus* (70%), *P. endodontalis* (63%) e *Dialister pneumosintes* (55%). *T. denticola* e *T. forsythia* foram às espécies mais freqüentemente detectadas nas amostras coletadas do Brasil. Estes resultados confirmam que algumas espécies podem ocorrer em diferenças marcantes entre diferentes localidades.

Sakamoto *et al.* (2006) com o objetivo de investigar a diversidade da microbiota associada a infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas comparando-as entre si; analisaram o comprimento dos fragmentos de restrições terminais de polimorfismo através de clone de genes 16S rRNA em 16 amostras de canais radiculares (8 assintomáticos e 8 sintomáticos). A análise seqüencial de 186 clones detectou 42 taxa, sendo 23 (55%) tipos de filós não cultiváveis, dos quais apenas 7 eram de infecções endodônticas. As bactérias mais comumente detectadas foram *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella* spp., *Dialister* spp., *Mogibacterium* spp., *Lachnospiraceae* spp., *Filifactor alocis*, *Megasphaera* spp., *Veillonella* spp. e *Bacteroides* spp. Sendo as espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Dialister pneumosintes* exclusivamente detectadas nos casos sintomáticos.

Vianna *et al.* (2006a) foram os primeiros a identificaram e quantificaram Archaea em canais radiculares de dentes com polpa necrosada e presença de lesão periapical, através do método “real-time PCR”. Foram coletadas amostras de 20 canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária. Para tal utilizou-se de um gene funcional *mcrA* específico para “methanogenic archea” e também do gene 16S RNA. Os resultados mostraram que Archea estava presente em 5 casos (25%), correspondendo a 2,5% da

população procariótica (bactérias + Archaea) presente nos canais radiculares. Os autores concluíram que Archeae pode estar intimamente relacionada às doenças infecciosas desempenhando a função de patógeno humano.

Gomes *et al.* (2006) investigaram a presença de *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* em 100 canais radiculares de 50 dentes com infecção endodôntica primária e 50 dentes com insucesso da terapia endodôntica através de PCR. Dos 100 canais radiculares analisados, *F. alocis* foi isolada em 23 e 12 canais radiculares, *T. forsythia* em 12 e 3 canais e *T. denticola* em 19 e 12 canais radiculares respectivamente de dentes com infecção endodôntica primária e com insucesso da terapia endodôntica. Associação foi encontrada entre infecção primária e a presença de *F. alocis* e *T. forsythia*. Também foram encontradas associações entre: dor e edema com a presença da espécie *F. alocis*; dor à percussão e *T. forsythia*; mobilidade e *T. forsythia*/*T. denticola*; canais “úmidos” e *T. forsythia*/*T. denticola* e *F. alocis*; exsudato purulento e *T. forsythia*/*T. denticola* e *F. alocis*; abscesso e *T. forsythia*/*T. denticola* e *F. alocis*. Os achados indicaram que as espécies *T. forsythia*, *T. denticola* e *F. alocis* parecem estar relacionadas com a presença de sinais e sintomas clínicos e que as espécies *F. alocis* e *T. forsythia* foram mais frequentemente detectadas nos casos de infecção endodôntica primária em relação aos dentes com insucesso da terapia endodôntica.

TÉCNICAS DE CULTURA X TÉCNICAS MOLECULARES

Estudos têm sido realizados com o objetivo de comparar a identificação microbiana pelo método de cultura e PCR, uma vez que os métodos moleculares são mais sensíveis e específicos.

Rolph *et al.* (2001) analisaram 41 amostras coletadas de 15 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão perirradicular e de 26 dentes refratários a terapia endodôntica através do método convencional de cultura e PCR 16S rRNA. Microrganismos foram isolados em 44% das amostras analisadas através de cultura e 68% através de PCR. Os resultados demonstram que técnicas moleculares podem detectar a

presença de bactérias quando não isoladas pelo método de cultura, e pode ser útil para identificação de uma diversidade de bactérias relacionadas às infecções endodônticas, inclusive a presença de bactérias não cultivadas.

Munson *et al.* (2002) através do método de cultura e 16S rDNA (PCR), analisaram amostras coletadas de 5 canais radiculares infectados com presença de lesão periapical crônica. Foram identificados de 65 espécies, das quais 26 foram detectadas apenas pelo método molecular. Em média 20,2 microrganismos foram detectados em cada amostra analisada. *Dialister* spp. foi a única espécie detectada nos 5 canais radiculares. Vinte e sete novos taxa foram detectados, 18 pertencentes ao filo dos firmicutes e 8 dos bacteroidetes. A análise molecular revelou uma microflora mais diversificada associada à infecções endodônticas quando comparada ao método de cultura.

Moraes *et al.* (2002) compararam a eficácia do método de cultura com os métodos moleculares 16S rDNA PCR e “checkerboard DNA-DNA hybridization” em detectar a presença de *F. nucleatum* em 13 amostras coletadas de canais radiculares de dentes infectados com presença de lesão periapical. *F. nucleatum* foi encontrado em 31% dos casos analisados (4/13); sendo detectado em 15,4% através dos métodos 16S rDNA PCR e “checkerboard DNA-DNA hybridization” e em 10% pelo método de cultura. Os resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os 3 métodos na identificação e detecção de *F. nucleatum*, apesar do pequeno número de amostras utilizadas e da baixa prevalência da espécie.

Gomes *et al.* (2005b) avaliaram através do método de cultura e nested PCR a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em 100 amostras coletadas de canais radiculares de dentes com lesão periapical (50 infecções primárias e 50 secundárias). *P. gingivalis* foi raramente isolada por cultura (1%), entretanto freqüentemente detectada por PCR (38%). *P. endodontalis* não foi isolado por cultura, a qual foi detectada apenas por PCR (25%). *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens* foram mais freqüentemente identificadas nos casos de infecção endodôntica primária. Tanto o método de cultura quanto método molecular utilizado, detectaram em alta freqüência a presença de microrganismos produtores de pigmentos negros.

Vianna *et al.* (2005) avaliaram a composição da microbiota endodôntica de 20 dentes com necrose pulpar através do método de cultura e microarray (DNA-chip). Os microrganismos mais frequentemente encontrados por DNA-chip foram: *M. micros*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *V. parvula*, *E. nodatum*, *P. gingivalis*, *A. odontolyticus* e *S. constellatus*. Já, as espécies mais frequentemente encontradas por cultura foram: *F. nucleatum*, *G. morbillorum*, *E. lentum*, *E. faecalis* e *P. acnes*. *T. forsythia* e *T. denticola* não foram identificados pelo método de cultura. Os autores concluíram que o DNA chip pode complementar o método de cultura para identificação da microbiota dos canais radiculares.

Willians *et al.* (2006) analisaram 29 amostras de canais radiculares coletadas de dentes com infecção endodôntica primária (n=15) e secundária (n=14), com o objetivo de comparar a detecção e quantificação de *E. faecalis* através das metodologias de real-time PCR (qPCR), transcriptase-reversa – PCR (RT-PCR) e cultura durante o tratamento endodôntico nos momentos antes/após instrumentação e após medicação intracanal. A prevalência de *E. faecalis* foi 3 vezes maior nos casos de infecção secundária quando comparado com os casos de infecções primárias. Os resultados demonstraram que a detecção de *E. faecalis* foi maior através qPCR quando comparado ao método de cultura. *E. faecalis* foi detectado através de RT-PCR em 4 amostras, das quais apresentaram cultura negativa. *E. faecalis* foi detectado em apenas um caso através do método de cultura. Estes resultados demonstram que qPCR e RT-PCR foram mais sensíveis para a detecção de *E. faecalis* nas infecções endodônticas quando comparados ao método de cultura.

Sedgley *et al.* (2006) compararam as metodologias de qPCR e cultura na detecção de *E. faecalis* de amostras coletadas de canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária (n=40) e secundária (n= 48). *E. faecalis* foi detectado em 10,2% e 79,5% por cultura e qPCR respectivamente. A espécie foi mais frequentemente detectada nos casos de infecção secundária quando comparada com os casos de infecção primária (88,6% x 67,5%). Os autores concluíram que qPCR foi mais sensível na detecção de *E. faecalis* quando comparado ao método de cultura.

Seol *et al.* (2006) investigaram a presença das espécies *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. tanneriae* em 36 amostras coletadas de canais

radiculares de dentes com lesão periapical e 4 amostras de abscessos através da cultura e multiplex-PCR. Pelo menos 1 das 5 espécies de bactérias produtoras de pigmento-negro (BPB) foi detectada em 65% (26/40) das amostras utilizando multiplex-PCR e 15% (6/40) por cultura. Os resultados demonstram que Multiplex-PCR foi mais rápido, sensível, específico, e efetivo na detecção de bacilos produtores de pigmentos negros quando comparado ao método convencional de cultura.

Gomes *et al.* (2006) investigaram a presença de *E. faecalis* em 100 amostras de canais radiculares de 50 dentes com necrose pulpar e 50 dentes com insucesso à terapia endodôntica através dos métodos cultura e nested PCR (16S rDNA). *E. faecalis* foi detectado em 23/100 e 79/100 amostras pelo método de cultura e PCR respectivamente. *E. faecalis* foi identificado em 2/50 dentes com necrose pulpar e 21/50 dentes com insucesso à terapia endodôntica através do método de cultura e em 41/50 e 38/50 através de nested PCR.

Tomazinho & Ávila-Campos (2006) detectaram a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em 100 amostras coletadas de canais radiculares de com infecção endodôntica crônica, comparando os métodos de cultura e PCR. Espécies foram identificadas em 33% das amostras através do método de cultura e 60% através do método molecular. *P. intermedia/nigrescens* (75,8%), *P. gingivalis* (27,3%) e *P. endodontalis* (9,1%) foram identificados nos respectivos percentuais através do método de cultura. *P. nigrescens* (43,3%), *P. gingivalis* (43,3%), *P. intermedia* (31,7%) e *P. endodontalis* (23,3%) foram identificados nos respectivos percentuais através de PCR. Bacilos produtores de pigmento negro parecem ser frequentes nas infecções endodônticas crônicas.

Com o advento das técnicas moleculares, mais de 700 espécies bacterianas pertencentes à 11 filos são conhecidas hoje como habitantes da cavidade bucal (Siqueira & Rôças, 2005).

2.1.2 Microbiota da saliva e do canal radicular

A cavidade bucal, em função de sua complexidade anatômica, apresenta vários sítios ecológicos, sendo uma das regiões mais complexas de todo o corpo humano. Só de bactérias existem mais de 30 gêneros diferentes, abrangendo mais de 500 espécies (De Lorenzo, 2004).

Em 2002, Socransky & Haffajee relataram que na cavidade bucal existem aproximadamente 350 espécies bacterianas já cultivadas e mais de 200 que foram detectadas através de métodos moleculares. Em número total de microrganismos, a microbiota bucal só pode ser comparada com a microbiota intestinal, sendo a bucal mais complexa devido à existência de dentes.

Diante desta flora microbiana diversificada, diversos patógenos oportunistas estão presentes, os quais são capazes de manifestar doenças no desequilíbrio entre microrganismo e hospedeiro.

Gênero *Candida* spp. nos canais radiculares

Os fungos são encontrados na cavidade bucal de indivíduos saudáveis sendo considerados membros normais da microflora (Soll, 2002). A cavidade bucal é a região mais colonizada por fungos, após a mucosa vaginal (SOLL *et al.*, 1991), sendo colonizada por diversas espécies já isoladas tais como: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. inconspicua* e *C. tropicalis* (Marsh & Martin, 1999).

A espécie de *C. albicans* tem sido isolada na cavidade bucal de indivíduos saudáveis em torno de 26% e em indivíduos com condições patológicas sistêmicas em torno de 47% (Odds, 1988). Em concordância com estes resultados, Mc Carthy *et al.* (1991), encontraram *Candida* spp. em 25% dos adultos saudáveis, 50% em pacientes hospitalizados e aproximadamente 90% em pacientes imunocomprometidos. Estudos estimam que a prevalência bucal de *Candida albicans* varia entre 3% e 77% nos adultos (Helms, 1956). Esta variação está relacionada a diferentes metodologias utilizadas. A

transformação de microrganismos comensais em patógenos depende de fatores predisponentes locais e sistêmicos do hospedeiro (Samaranayake & MacFarlane, 1990; Sheperd, 1992).

Nos canais radiculares, a presença de leveduras vem sendo reportada durante o curso das investigações microbiológicas com uma prevalência variando entre 0,6% e 10% (Leavitt *et al.*, 1958; Hobson, 1959; Kessler 1972) em casos não tratados e 3,7 e 10% nos casos de insucesso na terapia endodôntica (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). Poucos estudos se preocuparam em pesquisar a prevalência de fungos nos canais radiculares por técnicas de cultura (Tabela 1). Waltimo *et al.* em 1997, utilizando uma variedade de meios de cultura ricos em nutrientes e seletivos para fungos, demonstraram sua alta prevalência nos canais radiculares, variando entre 7% em dentes tratados a 55% em dentes não tratados endodônticamente. Verificaram ainda que o gênero *Candida* foi mais freqüentemente isolado entre os fungos, sendo predominante a espécie *Candida albicans* (Waltimo *et al.*, 1997).

Diversos autores relataram a presença de leveduras em infecções de canais radiculares (Tabela 1).

Tabela 1. Relato na literatura do isolamento de leveduras em canais radiculares.

Autor	Ano	Número amostras	Tratamento endodontico prévio	Prevalência de leveduras %	Espécies de leveduras identificadas
Slack	1953	514	medicação intracanal	5.8	Não especificado
MacDonald <i>et al.</i>	1957	46	Não	2.2	Não especificado
Leavitt <i>et al.</i>	1958	154	Não	10	Não especificado
Hobson 1959	1959	98	Não	0.6	Não especificado
Jackson & Halder	1963	214 214	Não Sim	26 33.6	<i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i>
Wilson & Hail	1968	263 263	Não Pasta de antibióticos	1.9 6.8	<i>C. albicans</i> Não especificado
Goldman & Person	1969	563	Não	0.5	Não especificado
Keisser	1972	6	Não	16	Não especificado
Slack	1975	560	Não	5.2	Não especificado
Matusow	1981	1	Não	0	<i>C. albicans</i>
Kinirons	1983	1	Não		<i>Candida</i> spp.
Tronstad <i>et al.</i>	1987	40	Sim	10	<i>C. albicans</i>
Damm <i>et al.</i>	1998	2	Não		<i>Candida</i> spp.
Nair <i>et al.</i>	1990	9	Sim	22	Não especificado
Najzar-Fleger <i>et al.</i>	1992	292	Não	55	<i>Candida</i> spp.
Sen <i>et al.</i>	1995	10	Não	40	Não especificado
Lomçsali <i>et al.</i>	1996	8	Não	25	Não especificado
Waltimo <i>et al.</i>	1997	967	Sim	4.9	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. incospicia</i>
Sundqvist <i>et al.</i>	1998	54	Sim	3.7	<i>C. albicans</i>
Molander <i>et al.</i>	1998	120	Sim	4.2	<i>C. albicans</i>
Baumgartner	2000	24	Não	21	<i>C. albicans</i>
Vianna <i>et al.</i>	2005 (a)	20	Não	10	<i>C. albicans</i>
Vianna	2006 (c)	24	Não	4.1 8.3	<i>Tryclosporun</i> <i>C. albicans</i>

Apesar da grande maioria das coletas sugerirem uma alta prevalência de leveduras em casos de dentes com insucesso, hipóteses têm surgido quanto à presença desses microrganismos nos canais radiculares após a instrumentação. Isto porque a baixa disponibilidade de nutrientes leva à diminuição do número de microrganismos presentes nos canais radiculares, favorecendo conseqüentemente o crescimento de outras espécies, capazes de sobreviver em meios escassos de nutrientes, como é o caso das leveduras (Sirén

et al., 1997; Sundqvist *et al.*, 1998). Uma outra possibilidade seria que as leveduras conseguiram ganhar o canal radicular via contaminação por saliva, devido a falha na assepsia do canal durante o tratamento e, até mesmo um selamento coronário inadequado.

Egan *et al.*, em 2002, relacionaram a prevalência e a diversidade dos fungos nas amostras coletadas da saliva (n=55) e do canal radicular (n=60) dos mesmos pacientes. Vinte e três leveduras foram isoladas em 19 amostras coletadas da saliva e 8 isoladas em 6 amostras oriundas dos canais radiculares. Entre as espécies isoladas na saliva, *C. albicans* foi a mais frequentemente identificada (73,9%) seguida de *B. mucilaginoso* (2/23), *C. dubliniensis* (1/23), *C. tropicalis* (1/23) e *Cryptococcus humicolus* (1/23). *B. mucilaginoso* (4/8), *C. albicans* (3/8) e *C. sake* (1/8) foram identificadas nos canais radiculares. Fungos estavam presentes em 37% das amostras coletadas da saliva. A prevalência nos canais radiculares foi de apenas 10% das amostras coletadas. Associação significativa foi encontrada entre a presença de fungos na saliva e no canal radicular.

Gênero *Enterococcus* spp.

Os enterococcus são habitantes usuais da cavidade bucal, gastrointestinal e da vagina (Jett *et al.*, 1994), que vivem em comensalismo com os humanos, adaptados à ambientes ricos em nutrientes, sem oxigênio e ecologicamente complexos. Para que espécies de *Enterococcus* spp. ajam como patógenos, inicialmente deve ocorrer uma série de eventos que permita a adesão do microrganismo aos sítios ligantes. Este microrganismo se adere a diferentes regiões, tornando o indivíduo colonizado (Jenkinson & Lamont, 1997), podendo participar como agente causal de uma variedade de infecções em humanos. Sendo encontrado nas infecções do trato urinário (Felmingham *et al.*, 1992), corrente sanguínea (Graninger & Ragette *et al.*, 1992), endocárdio (Eliopoulos, 1992); e dos canais radiculares (Sundqvist 1992a; LeGoff *et al.*, 1997; Sedgley *et al.*, 2006).

A espécie *Enterococcus faecalis* é a responsável pela maioria infecções enterococais em humanos (Ruoff *et al.*, 1990), sendo considerada a espécie predominante

do gênero *Enterococcus* (Molandaer *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). É a espécie mais frequente nos canais radiculares obturados (Sundqvist *et al.*, 1998; Dahlén, 2000).

Em 1964, Engström postulou que havia uma correlação direta entre a ocorrência de *Enterococcus* spp. na cavidade bucal e na câmara pulpar.

Os enterococcus são menos comuns na cavidade bucal (Kurrie *et al.*, 1981). Estudos demonstram a sua presença variando entre 4% e 34% (Williams *et al.*, 1950; Bahn *et al.*, 1960; Engström, 1965).

E. faecalis vêm sendo isolado em alta frequência de canais radiculares com insucesso na terapia endodôntica (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Dahlén 2000) e em menor proporção em dentes com polpas necrosadas e presença de lesões periapicais (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1996b).

A capacidade do *E. faecalis* em permanecer viável nos fluídos humanos por longo período de tempo (Love, 2001) e o alto índice de insucesso na terapia endôntica por selamento coronário inadequado, despertaram interesse nos pesquisadores em investigar a presença de enterococcus na saliva de pacientes com canais radiculares infectados.

Gold *et al.*, em 2004, verificaram a prevalência de *Enterococcus* spp. na saliva de pacientes voluntários com alta atividade de cárie e pacientes com canais radiculares infectados. Amostras foram coletadas da saliva e de outros sítios da cavidade bucal, em seguida identificadas pelo método de cultura. *Enterococcus* spp. foram detectados em 60% em indivíduos com faixa etária entre 20 e 40 anos e em 75% em indivíduos entre 10 e 14 anos. *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada.

Sedgley *et al.* (2005) estudaram a prevalência de *Enterococcus* spp. na cavidade bucal por PCR. *E. faecalis* foi detectado em 11% de 100 pacientes que estavam sob terapia endôntica e em 1% de 100 estudantes que não possuíam nenhum tratamento endodôntico previamente realizado.

Gold *et al.* (2006) investigaram pelo método de cultura e PCR a presença de *E. faecalis* em diversos sítios da cavidade bucal de 41 pacientes (n=136) sob terapia endodôntica. Os resultados demonstraram contraste entre a prevalência do microrganismo na cavidade bucal (68%) e a detecção no interior dos canais radiculares (5%). *E. faecalis*

foi mais freqüentemente isolado nas amostras coletadas da língua, seguida do sulco gengival, posteriormente na saliva e em menor percentual no interior dos canais radiculares.

Souto & Colombo (2007) avaliaram a presença de *Enterococcus faecalis* em biofilme subgengival e na saliva de pacientes com doença periodontal (n=169) e de indivíduos saudáveis (n=56) através de PCR. Dos resultados obtidos, *E. faecalis* esteve presente em 34.6% das amostras coletadas de biofilme subgengival e em 35.1% na saliva. *E. faecalis* foi detectado em maior número em pacientes com doença periodontal (biofilme subgengival: 47.8% e da saliva em 40.5%) quando comparado aos pacientes saudáveis (Biofilme subgengival: 17.1% e da saliva em 14.6%). Os resultados demonstraram que *E. faecalis* foi frequentemente detectado na microbiota bucal de pacientes com doença periodontal sugerindo que a infecção periodontal pode favorecer a colonização da espécie.

Razavi *et al.* (2007) com o objetivo de esclarecer possível correlação entre a ingestão de queijo e a presença de enterococci na cavidade bucal, analisaram amostras coletadas de bochecho de pacientes sem cárie e doença inflamatória bucal (n=50) antes e após a ingestão de diferentes marcas de queijos comercializados. Os resultados demonstraram que enterococci não foi detectado nas amostras iniciais de bochecho; entretanto esteve presente em todas as amostras coletadas após a ingestão, o qual foi capaz de permanecer viável por até 100 minutos após o consumo. Os autores sugeriram que a colonização por enterococci é transitória e que a infecção dos canais radiculares por enterococci pode ser de origem alimentar.

Enterobacteriaceae

A família das Enterobacteriaceae, bacilos gram-negativos, aeróbios, não esporulados, está dividida em diversos gêneros, sendo os principais, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* e *Yersinia*. Com poucas exceções, todos os membros de Enterobacteriaceae demonstram as características seguintes: a) fermentação da glicose; b) citocromo oxidase negativa; c) redução de nitrato a nitrito.

Entre as espécies mais frequentemente estudadas podemos incluir: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*.

A divisão dos gêneros pertencentes à família das Enterobacteriaceae ocorre em dois grandes grupos, não fermentadores (microrganismos que não utilizam carboidratos como fonte de energia ou os degradam através de outras vias metabólicas que não a fermentação) e fermentadores. Os primeiros indícios de diferenciação entre os dois grupos, é sugestivo pela ausência de evidências de fermentação da glicose, reação positiva de citocromo oxidase e ausência de capacidade de crescimento em agar MacConkey pelo grupo dos não-fermentadores.

Para a eleição de um sistema comercial de identificação deve-se avaliar principalmente as características oxidativas/fermentativas de todos os isolados desconhecidos, por meio do teste de oxidase. Pode-se suspeitar que um bacilo gram-negativo pertença ao grupo dos não-fermentadores quando cresce em ágar sangue, mas possui pequeno ou nenhum desenvolvimento em ágar MacConkey.

API 20E , é um sistema padronizado para a identificação das Enterobacteriaceae e outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos. Engloba 21 mini-testes bioquímicos e uma base de dados. Este teste permite a identificação dos seguintes gêneros das enterobactérias fermentadoras e oxidase negativa: *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Moellerella*, *Pantoeae*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*,

Outros gêneros identificados pelo API20E, mas que não fazem parte da família das enterobactérias são: *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Acinetobacter*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Chryseobacterium*, *Eikenella*, *Flavimonas*, *Myroides*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Non-fermenter*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas*.

2.2 DESINFECÇÃO DOS CANAIS RADICULARES

O melhor e mais seguro método utilizado para descontaminar o canal radicular é a criteriosa limpeza do conteúdo necrótico-séptico através do preparo mecânico e da irrigação (Schilder, 1974) uma vez, que ali, os microrganismos não podem ser alcançados pelas células de defesa do hospedeiro (Takahashi, 1998).

A limpeza mecânica tem sido considerada como a fase mais importante na terapia endodôntica, sendo capaz de reduzir em até 90% o número de células bacterianas (Siqueira Jr. *et al.*, 1999). Entretanto, as complexidades anatômicas dos canais radiculares limitam esta desinfecção mecânica (Biffi & Rodrigues, 1981). Baseado neste fato, para promover a desinfecção do sistema de canais radiculares, rompendo o equilíbrio do ecossistema microbiano, são utilizadas substâncias químicas auxiliares junto ao preparo mecânico dos canais radiculares.

Várias substâncias químicas auxiliares como o hipoclorito de sódio (NaOCl), EDTA, ácido cítrico, digluconato de clorexidina, solução de bis-dequalenio (salfizol) têm sido empregadas com o objetivo de promover a desinfecção do sistema de canais radiculares.

2.2.1 Substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico

As substâncias químicas auxiliares são empregadas no interior dos canais radiculares com a finalidade de promover dissolução de tecidos orgânicos vivos ou necrosados, eliminação máxima ou redução possível de microrganismos, lubrificação, quelação de íons cálcio e a suspensão de detritos oriundos da instrumentação. Devem apresentar propriedades físicas e químicas que as qualifiquem para essas finalidades.

O hipoclorito de sódio foi utilizado para a limpeza de feridas em 1915, por Dakin, sendo seu emprego em endodontia proposto por Walker em 1936. Sua utilização no preparo químico-mecânico de canais radiculares em diferentes concentrações tornou-se difundida graças a Grossman (1943). O seu emprego em diferentes concentrações torna esta

substância a mais utilizada mundialmente como substância química auxiliar durante o preparo dos canais radiculares.

De acordo com o seu mecanismo de ação, a substância NaOCl (hipoclorito de sódio, sal) reage com molécula de água (H₂O) formando NaOH (hidróxido de sódio, uma base forte) e HOCl (ácido hipocloroso, um ácido fraco). O hidróxido de sódio atua como solvente orgânico de gordura, formando sabão (fenômeno conhecido como saponificação). O ácido hipocloroso possui efeito antimicrobiano por liberar cloro nascente, que se liga ao grupamento NH dos aminoácidos, formando as cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana à partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002).

Estudos demonstram sua efetiva ação antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001, Vianna *et al.*, 2004) e sua capacidade de dissolução de tecido orgânico (Senia *et al.*, 1971; Cunningham & Balekjian, 1980; Abou-rass & Oglesby, 1981; Bealtz *et al.*, 2003; Naenni *et al.*, 2004). Possui outras propriedades tais como ação desodorizante, clareadora, lubrificante, baixa tensão superficial e capacidade de promover saponificação de lipídios (Grossman *et al.*, 1941; Bloomfield & Miles, 1979).

O uso do NaOCl durante a instrumentação endodôntica exerce efeito apenas na porção orgânica superficial da *smear layer* (Berg *et al.*, 1986; Baumgartner & Mader, 1987), não atuando na parte inorgânica da mesma. A remoção da *smear layer* é mais eficaz quando se associa o NaOCl a um agente quelante como o EDTA (White *et al.*, 1984, Baumgartner & Mader 1987).

Ao contrário da maioria dos antibióticos, as substâncias químicas auxiliares não apresentam seletividade para microrganismos, podendo gerar efeito tóxico sob as células vivas do hospedeiro. Entretanto a toxicidade do NaOCl está diretamente relacionado à sua concentração (Spångdberg *et al.*, 1973; Becking, 1991; Ferraz *et al.*, 2001; Hülsman & Hahn, 2000; Tanomaru-Filho *et al.*, 2002). Embora *in vitro* apresente pronunciada citotoxicidade (Pashley, 1985), *in vivo* este efeito não é observado, desde que a solução seja mantida no interior do canal radicular, sem que extravase para os tecidos periapicais (Sabala & Powell, 1989).

A atividade do hipoclorito de sódio como substância química auxiliar vem sendo avaliada ao longo dos anos por diversos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por diferentes autores, os quais comparam a sua capacidade de dissolução de tecido orgânico e ação antimicrobiana frente aos endodonto-patógenos, em relação às demais substâncias empregadas durante o preparo químico-mecânico.

2.2.2 Ação do hipoclorito de sódio na dissolução de tecido orgânico

Senia *et al.* (1971) avaliaram *ex vivo* a capacidade de solvente tecidual do hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% no tecido pulpar de 61 molares recém-extraídos, divididos em grupos: A- 30 canais da raiz mesial de molares inferiores foram irrigados com Clorox (NaOCl 5,25%) por 15 minutos, e o outro canal da raiz mesial irrigado com solução salina (grupo controle); B- 31 canais da raiz mesial de molares inferiores foram tratados com Clorox durante 30 minutos. Em seguida cortes foram realizados à 1 milímetro (mm), 3mm e 5mm do ápice, os quais foram corados e, posteriormente analisados ao microscópio óptico. Os autores concluíram que Clorox foi mais efetivo do que a solução salina na dissolução de tecido pulpar. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na capacidade de limpeza do Clorox em 1mm e 3 mm do ápice. Nos 5mm, clorox foi estatisticamente mais efetivo quando comparado à solução salina. Nos dentes dos quais foram detectados istmo entre os 2 canais, mais tecido pulpar foi dissolvido com Clorox do que com solução salina, sendo estatisticamente significativa nos 3 níveis. Clorox foi mais efetivo nos canais mais amplos quando comparado aos mais estreitos. Os canais mesiais de molares inferiores não foram adequadamente limpos nos 5 mm apicais pela técnica endodôntica empregada. A ação do hipoclorito de sódio como agente irrigante na dissolução de tecido pulpar nos 3mm apicais de dentes com canais estreitos é questionável.

Cunningham & Balekjian (1980) compararam *in vitro* a capacidade de dissolução do colágeno pela ação do hipoclorito de sódio nas concentrações 2,6% e 5,2% nas seguintes temperaturas: ambiente (21 °C) e corpobucal (37 °C). Os resultados demonstraram que o

efeito do NaOCl na concentração 2,6% e na temperatura de 37 °C sob foi similar ao NaOCl 5,2% tanto na temperatura de 21°C quanto na de 37 °C.

Abou-Rass & Samuel (1981) investigaram capacidade de dissolução do hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% e 2,6%, nas temperaturas de 73,2 ° F e 140 ° F, em tecidos conjuntivos de ratos. Os resultados demonstraram que o NaOCl aquecido a 140 ° F aumentou efetivamente a capacidade de solvente em todos os espécimes de tecidos vivos, fixados e necróticos analisados. Sob tecido vivo, a dissolução foi mais rápida do que no tecido necrótico. O efeito mais longo da dissolução foi observado nos espécimes de tecidos fixados. O NaOCl 5,25% foi mais efetivo quando comparado à concentração de 2,6%, independente das condições dos tecidos avaliados e da temperatura da substância utilizada. O hipoclorito de sódio nas diferentes concentrações, aquecido a 140 ° F, apresentou maior efeito na dissolução de tecido conjuntivo quando comparado ao não aquecimento da solução. Concentrações mais elevadas de NaOCl são mais eficazes na dissolução tecidual; sendo esta mais efetiva nos tecidos vivos, seguida de tecidos necrosados e tecidos fixados.

Beltz *et al.* (2003) avaliaram *in vitro* a capacidade dos irrigantes endodônticos: NaOCl (5,25%, 2,60%, 1,30%), NaOCl, EDTA 17% e MTAD (ácido cítrico, doxaciiclina, tween 80) em dissolver componentes orgânicos e inorgânicos da *smear layer* presente após a instrumentação de origem pulpar e dentinária de dentes bovinos. Dentre os resultados obtidos, a solubilização das polpas foi igual para as concentrações de 5,25% e 2,60% de NaOCl, sendo a concentração de 5,25% capaz de dissolver todo o componente orgânico da dentina. O EDTA foi eficaz na solubilização da matéria inorgânica/ orgânica da dentina e parte orgânica da polpa, sendo capaz de dissolver mais de 70% da dentina e mais de 51% da polpa. Os efeitos de solubilização do MTAD na polpa e na dentina foram semelhantes ao do EDTA; entretanto, a maior diferença entre a ação destas soluções foi a grande afinidade ligante da doxiciiclina presente no MTAD na dentina.

Naenni *et al.* (2004) estudaram a capacidade de dissolução de tecido necrótico obtida do palato de porcos através do uso de diferentes substâncias químicas auxiliares - hipoclorito de sódio (NaOCl) 1%, clorexidina 10%, peróxido de hidrogênio 3% e 30%, ácido peracético 10% e ácido cítrico 10%. Os espécimes padronizados de tecido necrótico foram incubados nas soluções irrigantes, e os pesos dos tecidos foram medidos em

diferentes tempos avaliados. Os resultados indicaram que nenhuma solução utilizada como irrigante, apresentou capacidade de dissolução de tecido, exceto o NaOCl. Os autores concluíram que este fato pode ser importante ao considerar o uso de outros irrigantes, que não seja o NaOCl.

Sirtes *et al.* (2005) avaliaram o efeito da dissolução de tecido pulpar utilizando hipoclorito de sódio nas concentrações 5,25%, 2,62%, 1% nas temperaturas 20 °C, 45°C e 60 °C. Os resultados indicaram que o hipoclorito de sódio 1% à 45 °C foi tão eficaz quanto a concentração de 5,25% à 20°C. Entretanto, NaOCl 1% à 60 °C foi o mais efetivo na dissolução do tecido pulpar.

2.2.3 Ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio utilizado como substância química-auxiliar no preparo dos canais radiculares

Shih *et al.* (1970) realizaram um estudo laboratorial com o objetivo de avaliar o efeito bactericida do clorox (NaOCl 5,25%, pH 11 a 11,5) contra “*Streptococcus faecalis*” e *Staphylococcus aureus* em dentes extraídos. Dentre os resultados obtidos, os autores concluíram que é necessário utilizar clorox em toda a extensão do canal radicular para obter um efeito “esterilizante” de imediato em dentes humanos extraídos e inoculados com “*S. faecalis*” e *S. aureus*; entretanto, a irrigação em toda extensão com clorox, não assegura a esterilização por completo do canal. O relato de cultura negativa após o tratamento indicou que a população microbiana no canal radicular foi altamente reduzida, porém não está relacionada à esterilização do mesmo. A ação mecânica do fluxo e refluxo da solução salina não é efetiva na remoção de bactérias do interior dos canais radiculares. Os autores ainda concluíram que estudos futuros devem considerados sobre o efeito do NaOCl em dentes extraídos inoculados com culturas mistas de microrganismos da cavidade bucal e estudos clínicos deveriam ser realizados para uma avaliação final da eficiência bactericida do NaOCl.

Foley *et al.* (1983) avaliaram *in vitro* a ação antibacteriana de substância irrigantes em 100 incisivos humanos extraídos, os quais foram inoculados com *Bacteroides*

melaninogenicus e *Peptostreptococcus anaerobius* e irrigados com as seguintes substâncias: 1- 12 mL de solução salina estéril 0,9%; 2- 10 mL de Clorox; 3- 10 mL de Gly-Oxide; 4- canais irrigados alternando 1mL de Gly-oxide, 1 mL de Clorox. Os resultados indicam que o uso alternado de Gly-oxide e Clorox apresentou ação antimicrobiana eficaz contra as espécies inoculadas.

Ayhan *et al.* (1999) avaliaram o efeito antimicrobiano do NaOCl 5,25% e 0,5%, gluconato de clorexidina (CHX) 2%, álcool 21%, paramonoclorofenol (Cresophene) contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* através de halos de inibições em àgar. Os resultados demonstraram que o NaOCl 5,25% foi efetivo contra todos os microrganismos testados com zona de inibição significativa. Com a diminuição da concentração do mesmo há uma diminuição proporcional de sua ação antimicrobiana era diminuída proporcionalmente. Cresophene apresentou zonas de inibições maiores quando comparado aos demais irrigantes avaliados. O álcool apresentou os menores halos de inibição, não sendo estatisticamente diferente da CHX. Os autores concluíram que o NaOCl 5,25% apresentou maior efeito antimicrobiano quando comparado aos demais irrigantes testados. A redução na concentração do NaOCl (0,5%) resultou em uma diminuição no seu efeito antimicrobiano. Cresophene quando comparado ao álcool 21%, NaOCl 0,5% e CHX 2%, mostrou maior ação antimicrobiana.

Önçanğ *et al.* (2003) realizaram estudo *in vitro* comparando as propriedades antimicrobianas e a toxicidade do NaOCl 5,25%, gluconato de clorexidina 2% e 0,2% e CHX 0,2% associada ao cetrímide (Cetrexidin®) em 60 dentes permanente recém-extraídos intactos os quais foram contaminados com *Enterococcus faecalis*. Separadamente, foi realizado um estudo *in vivo* no qual amostras foram coletadas de canais radiculares de 98 dentes decíduos com necrose pulpar. Em seguida os irrigantes foram utilizados para limpeza dos canais, os quais permaneceram vazios por 48 horas. Comparações antes e após 48 horas da irrigação em relação ao crescimento aeróbio/ anaeróbio facultativo e estritos foram realizadas. Os efeitos tóxicos dos irrigantes foram avaliados injetando as substâncias no subcutâneo de ratos. Nos estudos laboratoriais, cetrexidin® foi mais efetivo contra *E. faecalis* quando comparado ao NaOCl 5,25% por 5 minutos. Similarmente, no estudo *in*

vivo, cetrexidin® foi mais efetivo sob bactérias anaeróbias estritas do que o NaOCl 5,25% em 48 horas. No final de 2 semanas, a toxicidade da solução de NaOCl foi maior do que os outros irrigantes testados. Os autores concluíram que o Cetrexidin® e o gluconato de CHX 2% foram mais efetivos, apresentaram mais efeitos antibacterianos residuais e baixa toxicidade quando comparados ao NaOCl 5,25%.

Vianna *et al.* (2004) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina nas concentrações de 0,2%, 1% e 2% (CHX gel e líquida) contra patógenos-endodônticos, comparando com os resultados alcançados pelo hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. Os resultados demonstram que tanto a CHX gel quanto a líquida 2% foram eficazes na eliminação de *S. aureus* e *C. albicans* em 15 segundos. A formulação gel foi capaz de eliminar *E. faecalis* em apenas 1 minuto de ação. Todos os irrigantes testados foram capazes de eliminar *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em 15 segundos. O tempo requerido para as concentrações de 1% e 2% de CHX líquida para eliminar todos os microrganismos foram semelhantes ao requerido pelo NaOCl 5,25%. Os autores concluíram que a ação antimicrobiana está relacionada ao tipo, a concentração e a forma de apresentação dos irrigantes, assim como a suscetibilidade dos microrganismos.

Gomes *et al.* (2005a) avaliaram *in vitro* o efeito da clorexidina (CHX) 2% e do hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% na desinfecção de cones de guta-percha e verificaram também a contaminação dos cones de guta-percha nas caixas, dentro das quais são comercializados, e identificar contaminação intencional por microrganismos durante a manipulação dos mesmos. Os resultados demonstram que a CHX não foi efetiva na eliminação de *Bacillus subtilis* esporulados da superfície dos cones após 72 horas de contato, porém o NaOCl foi capaz de eliminar os esporos após 1 minuto de desinfecção. O gênero mais freqüentemente isolado após a contaminação com as luvas durante a manipulação dos mesmos foi o *Staphylococcus* spp. Os autores concluíram que o NaOCl 5,25% é um agente efetivo e rápido na descontaminação de cones de guta-percha.

2.2.4 Estudos *in vitro* da redução antimicrobiana

Siqueira Jr. *et al.* (1999) determinaram *in vitro* a redução da população microbiana de canais radiculares antes e após o preparo químico-mecânico. Os canais foram infectados com *E. faecalis* e instrumentados manualmente com limas Nitiflex, GT e Profile 0.06 (série 29, rotatória). A irrigação foi realizada com solução salina. Os autores verificaram que todas as técnicas utilizadas foram capazes de reduzir mais que 90% do número de microrganismos do interior dos canais radiculares.

Waltimo *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* a suscetibilidade antimicrobiana de 7 cepas de *Candida albicans* contra 4 irrigantes- NaOCl 5% e 0,5%, iodine 2%, iodeto de potássio 4%, acetato de clorexidina 0,5%, hidróxido de cálcio 0,08% e suas associações. Os resultados mostraram que *C. albicans* foi altamente resistente ao uso do hidróxido de cálcio. NaOCl (5% e 0.5%), iodine (2%), e iodeto de potássio (4%) eliminaram todas células fúngicas dentro de 30 segundos; em contraste com a CHX 0,5%, a qual mostrou completa eliminação após 5 minutos. As combinações entre os desinfetantes foram iguais ou até menos efetivas que o irrigante isoladamente. Todas as cepas de *C. albicans* testadas apresentaram suscetibilidade muito similares entre as substâncias avaliadas. Os autores concluíram que o NaOCl, iodeto de potássio e a CHX *in vitro* foram mais eficazes do que o hidróxido de cálcio contra *C. albicans*. Entretanto, a combinação de hidróxido de cálcio e NaOCl ou CHX podem conferir um amplo espectro antimicrobiano com efeitos duradouros.

Dametto (2002) comparou *in vitro* a atividade antibacteriana da clorexidina gel 2%, clorexidina líquida 2% e o NaOCl 5,25% contra *E. faecalis*. Após a instrumentação das raízes de pré-molares inferiores humanos pela técnica de instrumentação seriada, as raízes foram autoclavadas e inoculadas em monoculturas de *Enterococcus faecalis* por um período de 7 dias. Em seguida, os dentes foram divididos em 5 grupos e submetidos ao preparo químico-mecânico com variação apenas da substância química auxiliar. Para se avaliar o potencial antimicrobiano das substâncias, foram realizadas 3 coletas bacteriológicas denominadas: pré-tratamento (coleta realizada antes do preparo químico-mecânico); pós tratamento (imediatamente após o preparo químico-mecânico) e final (7

dias após o preparo químico-mecânico). Uma vez obtidas as coletas, estas foram cultivadas a fim de determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), para posterior análise estatística dos resultados. Dentre os resultados obtidos, o gluconato de clorexidina 2% tanto na forma de gel quanto líquida promoveram uma redução significativa nas coletas imediatas e 7 dias após. Já o hipoclorito de sódio 5,25% apenas reduziu UFC na coleta imediata, constatando crescimento bacteriano na coleta final. Os autores concluíram que entre as soluções químicas auxiliares utilizadas, o gluconato de clorexidina 2% gel e líquida foram mais efetivos que o hipoclorito de sódio 5,25% contra *E. faecalis*.

Coldero *et al.* (2002) compararam a redução microbiana dos canais radiculares após a utilização de sistemas rotatórios com e sem alargamento apical. Foram avaliadas 38 raízes palatinas de molares superiores com ápices formados. As raízes foram esterilizadas em seguida, contaminadas com *E. faecalis*. Os dentes foram preparados pela técnica “step-down” com limas rotatórias GT a 350 rpm e irrigados com hipoclorito de sódio e EDTA. Os resultados mostraram que no grupo do alargamento apical, 94% dos dentes estavam livres de microrganismos, enquanto que no grupo sem alargamento apenas 81% dos dentes estavam livres de microrganismos; entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Os autores concluíram que pode não ser necessário o alargamento apical quando uma conicidade adequada na coroa é alcançada, permitindo uma irrigação eficiente com os agentes antimicrobianos no sistema de canais radiculares.

Siqueira Jr. *et al.* (2002a) determinaram *in vitro* a redução microbiana nos canais radiculares instrumentados pela técnica manual com limas de níquel titânio irrigados com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) seguido do uso de ácido cítrico (G1), limas rotatórias alternadas irrigando com NaOCl 2,5% e clorexidina líquida 2% (G2), e limas rotatórias GT irrigando com NaOCl 2,5% (G3). As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e UFC contadas. Todas as técnicas utilizadas promoveram redução microbiana similar nos canais radiculares. Os autores concluíram que é importante utilizar solução irrigadora com potencial antimicrobiano durante o preparo químico-mecânico independentemente da técnica empregada.

Siqueira Jr. *et al.* (2002b), analisaram *in vitro* duas técnicas de instrumentação e diferentes métodos de irrigação na redução bacteriana. Cinquenta dentes unirradiculares

extraídos em humanos foram esterilizados e inoculados com *E. faecalis*, para posterior instrumentação de acordo com os seguintes grupos: 1- hipoclorito de sódio 2,5% (n=10); 2- canais irrigados alternando hipoclorito de sódio 2,5% e ácido cítrico 10% (n=10); 3- canais irrigados alternando hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2% (n=10); 4- gluconato de clorexidina 2% (n=10) e o grupo controle, irrigados com solução salina estéril 0,85% (n=10), variando as técnicas de instrumentação- rotação alternada e níquel titânio manual. As coletas foram realizadas antes e após o preparo químico-mecânico, em seguida, foram realizadas diluições seriadas, plaqueadas e UFC contadas. Todas as técnicas e substâncias químicas utilizadas foram capazes de reduzir significativamente o número de células bacterianas dos canais radiculares, não havendo diferença estatisticamente significativa. Entretanto, todos os grupos avaliados foram superiores ao grupo controle. Os resultados suportam os achados na literatura relacionados a importância do uso de irrigantes com ação antimicrobiana durante o preparo químico-mecânico, independente da solução ou técnica de instrumentação utilizada.

Berber (2005) avaliou *in vitro* o uso de substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-mecânico: clorexidina (gel e líquida 2%), NaOCl nas concentrações de 5,25, 2,5 e 0,5% e soro fisiológico. Duas técnicas de instrumentação: 1) Híbrida cervico-apical- FOP-UNICAMP, 2) instrumentação rotatória com HERO 642, na redução de *E. faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários. Foram utilizadas 270 raízes de pré-molares inferiores, as quais foram contaminadas com *E. faecalis* e, divididas em 18 grupos nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso das substâncias químicas auxiliares. Amostras bacteriológicas foram coletadas do canal radicular antes e imediatamente após o preparo químico-mecânico, as UFC contadas; amostras de dentina foram removidas dos terços apical, médio e cervical. Na luz do canal radicular, todas as substâncias inclusive soro fisiológico quando associados à instrumentação mecânica, promoveram redução microbiana de quase 100% nas coletas microbiológicas imediatamente após o preparo químico-mecânico. Nas coletas resultantes das raspas de dentina, em todos os terços, técnicas e profundidades o NaOCl 5,25%, CHX gel 2% obtiveram os melhores resultados na redução microbiana dos túbulos dentinários seguidos do NaOCl 2,5%, clorexidina líquida 2% e NaOCl 0,5%. Concluiu que o NaOCl 5,25% e

clorexidina gel 2% com as técnicas de instrumentação cervico-apical da FOP-UNICAMP e HERO, foram mais efetivos na redução de *E. faecalis* nos túbulos dentinários e no canal radicular.

Colak *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* a redução da população microbiana dos canais radiculares através do preparo mecânico com soro fisiológico utilizando 3 diferentes técnicas de instrumentação. Os canais foram contaminados com *E. faecalis* e instrumentados com limas Hedströen manuais, limas rotatórias Giromatic e HERO 642. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e UFC contadas. Todas as técnicas de instrumentação foram eficazes na redução do número de microrganismos dos canais radiculares.

Berber *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* o uso de NaOCl nas concentrações de 5,25, 2,5 e 0,5% e soro fisiológico variando técnicas de instrumentação: Híbrida cervico-apical (FOP-UNICAMP), instrumentação rotatória com HERO 642 na redução de *E. faecalis* do canal radicular e dos túbulos dentinários. Foram utilizadas 180 raízes de pré-molares inferiores contaminadas com *E. faecalis*, divididas em grupos, nos quais técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso de diversas concentrações de NaOCl. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e após o preparo químico-mecânico através da remoção de dentina dos terços apical, médio e cervical. Independente do terço e da técnica utilizada, o NaOCl 5,25% mostrou ser mais efetivo na redução microbiana dos túbulos dentinários quando comparado as demais concentrações. Os autores concluíram que o NaOCl especialmente nas mais altas concentrações, independentemente da técnica de instrumentação utilizada, foi capaz de eliminar *E. faecalis* dos túbulos dentinários.

Marquezan *et al.* (2006) comparam a eficácia do hipoclorito de sódio 6%, clorexidina gel 2%, EDTA 17% e Bio Pure MTDA na irrigação final de 48 dentes contaminados com *Candida albicans*, subdivididos em 4 grupos, sendo cada um deles com controle positivo e negativo. Após o preparo dos canais radiculares, os dentes foram inoculados com cepa ATCC de *Candida albicans* (ATCC60193) e incubados por 72 horas. Os grupos foram irrigados com as seguintes substâncias: 6% NaOCl, CHX gel 2%, 1mL EDTA 17% e 5 mL de Bio Pure MTAD. Alíquotas foram plaqueadas em ágar sabouraud

dextrose, e UFC contadas. Os resultados demonstraram que NaOCl 6% e CHX 2% foram semelhantes na redução de UFC. Bio Pure MTAD e o EDTA 17% apresentaram maior atividade antifúngica quando comparados às substâncias químicas avaliadas.

Kho & Baumgartner (2006) realizaram uma investigação a fim de comparar a eficácia antimicrobiana da irrigação utilizando 1,3% NaOCl/ Biopure MTAD versus NaOCl 5,25%/ EDTA 15% nos 5 mm apicais de raízes contaminadas por *E. faecalis*. Os resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa na contagem de colônias (UFC/mg) entre os irrigantes avaliados. O estudo demonstrou não haver diferença na eficácia antimicrobiana entre os irrigantes NaOCl 5,25%/ EDTA 15% versus irrigação com 1,3% NaOCl/Biopure MTAD nos 5 mm apicais de raízes infectadas com *E. faecalis*.

Dunavant *et al.* (2006) compararam *in vitro* a eficácia de irrigantes intracanaís contra biofilme de *E. faecalis*, os quais foram imersos durante 1 e 5 minutos nas soluções testadas. Dentre os resultados obtidos, não houve diferença estatisticamente significativa entre o tempo e o percentual de eliminação dos microrganismos. O percentual de eliminação de bactérias do biofilme foi de 99,9% (NaOCl 6%), 99,78% (NaOCl 1%), 78,06% (Smear Clear™), 60,49% (CHX 2%), 26,99% (REDTA) e 16,08% (Bio Puure™ MTAD™). Os autores concluíram que tanto o NaOCl 1% quanto NaOCl 6% foram mais eficientes na eliminação *in vitro* de *E. faecalis* em biofilmes quando comparados com demais soluções irrigantes avaliadas.

Baumgartner *et al.* (2007) compararam *in vitro* a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio 1,3%/Biopure MTAD com o hipoclorito de sódio 5,25%/15% EDTA na eliminação de *E. faecalis*. Os resultados demonstraram uma desinfecção consistente dos canais radiculares com NaOCl 5,25%/EDTA 15%. Cinquenta por cento dos canais radiculares apresentaram contaminação após o uso de 1,3% NaOCl/ Biopure MTAD.

Garcez *et al.* (2007) com o objetivo de investigar *in vitro* a ação do laser vermelho associado à pasta base fotosensitiva na redução de *Enterococcus faecalis*, realizaram preparo químico-mecânico em 30 canais radiculares, posteriormente contaminando-os com *E. faecalis*. No grupo químico (n=10) os canais foram irrigados com solução de NaOCl 0,5% (hipoclorito de sódio), permanecendo inundados por 30 minutos; já no grupo do laser, a pasta-base fotosensitiva foi mantida por 5 minutos nos canais radiculares, em seguida

irradiada com laser a 658 nm utilizando fibra óptica para E de 1.8 j durante 3 minutos; grupo controle (n=10) foi realizado para confirmar a contaminação dos dentes. Após o tratamento, o conteúdo dos canais radiculares foi coletado, diluído serialmente e cultivado a fim de determinar o número UFC. Os resultados demonstraram que a pasta fotosensitiva e o laser individualmente não apresentaram efeito bactericida. A solução química e o laser fotosensitivo foram capazes de reduzir em 92,25% e 99,2% a carga bacteriana respectivamente. Os autores concluíram que o laser fotosensitivo foi eficaz na redução de *E. faecalis* nos canais radiculares e deveria ser um adjunto no tratamento endodôntico.

2.2.5 Estudos *in vivo* da redução microbiana

Byström & Sundqvist (1981) avaliaram a presença de bactérias em 15 canais radiculares de dentes unirradiculares, com presença de lesão periapical, irrigados com solução salina fisiológica durante a instrumentação. Colônias bacterianas foram isoladas em 100% das amostras iniciais - média de $4,0 \times 10^5$ UFC/mL, variando de 10^2 a 10^7 UFC/mL. A instrumentação reduziu consideravelmente o número de bactérias dos canais radiculares, cujos valores de UFC/mL variaram entre 10^2 e 10^3 ; bactérias foram eliminadas em 8 dentes após o tratamento. Sete canais radiculares apresentaram infecção persistentes mesmo após as 5 sessões de tratamento. Os dentes que apresentaram infecções persistentes foram os dentes que apresentaram maior número de bactérias na coleta inicial.

Byström & Sundqvist (1983) avaliaram a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio 0,5% (NaOCl) em 30 canais radiculares de dentes apresentando coroa intacta, necrose pulpar e presença de lesão periapical. Todas as amostras bacteriológicas iniciais coletadas dos canais radiculares evidenciaram crescimento bacteriano, sendo isoladas 169 espécies bacterianas, com 80% de incidência de anaeróbios estritos. Na maioria das amostras, mais de uma espécie foi identificada, obtendo em média 4 espécies por canal radicular. Os gêneros mais frequentemente isolados foram *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Bacteroides* spp. Foram realizados 4 preparos biomecânicos, com intervalos de 2 a 4 dias, coletando amostras em cada um deles. Após o tempo pré-

estabelecido, testes bacteriológicos dos canais foram realizados. Os resultados evidenciaram cultura negativa em 12 de 15 espécimes tratados com NaOCl 0,5% e 8 de 15 espécimes tratados com soro fisiológico. Os resultados sugerem melhor efetividade da solução de NaOCl 0,5% como irrigante endodôntico quando comparado ao soro fisiológico.

Byström & Sundqvist (1987) avaliaram a ação antibacteriana do hipoclorito de sódio 0,5% após o preparo biomecânico com o uso de ultra-som em 31 dentes unirradiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical visível radiograficamente. Culturas bacteriológicas em anaerobiose foram realizadas no decorrer de 7 dias da primeira e da segunda sessão, apresentando 29% e 22,5% de culturas positivas respectivamente.

Sjögren e Sundqvist (1987) avaliaram o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio 0,5% comparando a instrumentação manual e ultra-sônica em canais radiculares infectados. Os resultados indicaram que a técnica de ultra-som foi mais eficiente na eliminação de bactérias dos canais quando comparada à técnica manual. Os autores concluíram que apesar do ultra-som definitivamente aumentar a desinfecção dos canais radiculares, o uso de uma medicação intracanal entre as sessões, faz-se necessário com o objetivo de diminuir ainda mais o número de células bacterianas.

Gomes *et al.* (1996b) avaliaram as variações na suscetibilidade da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Os autores investigaram 42 canais radiculares coletando amostras microbiológicas antes e após a instrumentação. Nos 15 casos de infecção endodôntica primária, não foi observada mudança na microbiota. Já nos 27 casos de infecção secundária, houve uma redução no número de *Peptostreptococcus* spp.. Ao avaliar os 42 casos conjuntamente, houve um declínio no número de anaeróbios após o procedimento biomecânico, especialmente de espécies Gram-positivas como *Peptostreptococcus* spp. Os autores concluíram que algumas espécies foram mais resistentes ao preparo biomecânico.

Shuppig *et al.* (2000) avaliaram a redução bacteriana nos canais radiculares após o uso de limas rotatórias de níquel titânio e irrigação com NaOCl 1,25%, assim como a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio utilizado por 7 dias. Quarenta e dois dentes com periodontite apical aguda foram examinados. As amostras foram coletadas antes e após o uso da medicação. A coleta inicial mostrou infecção em todos os canais avaliados; 61,9% e

92,5% dos casos apresentaram cultura negativa após a instrumentação e após medicação durante 7 dias respectivamente. Os autores concluíram que a instrumentação rotatória com NaOCl é um passo importante na redução da microbiota dos canais radiculares, entretanto não foi possível eliminar microrganismos por completo dos canais radiculares. Os autores sugerem a utilização da medicação intracanal por 7 dias, a qual reduziu ainda mais a microbiota dos canais radiculares.

Peters *et al.* (2002) avaliaram os efeitos da instrumentação, irrigação com NaOCl 1% e medicação intracanal por 4 semanas em dentes com polpa infectadas e com presença de lesões periapicais. Foram coletadas amostras de 43 dentes antes (S1) e após (S2) instrumentação durante a primeira consulta, antes (S3) e após (s4) o tratamento na segunda visita de atendimento. Na primeira visita os dentes foram instrumentados e divididos em 2 grupos, um grupo de dentes foi obturado (metade dos dentes avaliados) e outro grupo os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio ou solução salina. Após 4 semanas os dentes que continham medicação foram acessados novamente e coletados (S3 e S4). O número de UFC/mL das amostras diminuíram significativamente no final da primeira sessão de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL para $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Não houve aumento no número de UFC entre S2 e S4. As espécies mais frequentemente isoladas foram *P. intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *A. odontolyticus*, *P. acnes* e *P. micros*. Os autores concluíram que o número de microrganismos aumentou no período entre as visitas, apesar do uso do hidróxido de cálcio.

Ercan *et al.* (2004) compararam a ação antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Amostras microbiológicas de canais radiculares foram coletadas de 32 dentes, incisivos e pré-molares. Após a contagem das UFCs, os autores concluíram que a solução de NaOCl 5,25% e clorexidina gel 2% foram eficazes na redução microbiana em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

McGurkin-Smith *et al.* (2005) avaliaram *in vivo* a redução microbiana promovida pela instrumentação com limas Profile GT e irrigação com NaOCl 5,25% e EDTA 17%. Trinta e um dentes com periodontite apical foram selecionados. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e após 7 dias de medicação com hidróxido de

cálcio. As coletas iniciais demonstraram 93,55% dos casos positivos para a presença de microrganismos, 52,72% após a instrumentação e 14% após o uso da medicação intracanal por 7 dias. Os autores concluíram que a redução microbiana nos canais radiculares não foi suficiente para deixá-los livres de bactérias; e que o hidróxido de cálcio auxiliou nesse processo de desinfecção dos canais radiculares.

Vianna *et al.* (2006b) avaliaram *in vivo* a redução microbiana após o preparo químico-mecânico em canais radiculares de dentes humanos com polpa necrosada e presença de lesão periapical. Foram selecionados 32 dentes unirradiculares, os quais foram instrumentados com o auxílio da clorexidina gel 2% e hipoclorito de sódio 2,5%. A redução microbiana foi avaliada através da reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando dois diferentes experimentos (SYBRGreen e Taq Man). A título de comparação, a redução microbiana também foi avaliada pelo método tradicional de cultura. Os resultados mostraram que tanto o grupo da clorexidina quanto o do hipoclorito de sódio foram capazes de reduzir mais de 96% da quantidade de microrganismos no interior dos canais radiculares. Entretanto, através da cultura o grupo instrumentado com NaOCl apresentou maior número de canais livres de microrganismos (75% dos casos), quando comparado ao grupo da clorexidina, o qual apresentou 50% de culturas positivas. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio apresentou maior capacidade de eliminar microrganismos presentes nos canais principais de dentes com infecção endodôntica primária.

Tanoramu-Filho *et al.* (2006) avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo biomecânico utilizando diferentes soluções irrigantes em 78 pré-molares de cães, após indução de lesão periapical. Os dentes foram preparados utilizando as seguintes soluções: 1- hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%; 2- clorexidina 2% (CHX); 3- solução salina; 4- controle (Sem preparo biomecânico). A avaliação microbiológica dos canais radiculares foi realizada antes da instrumentação e 30 dias após o preparo dos canais radiculares, através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) utilizando diferentes meios de cultura. Os resultados demonstraram que houve redução microbiana nos grupos do NaOCl e CHX, a qual foi maior no segundo grupo. O grupo controle apresentou um aumento no número de microrganismos. Os autores concluíram que as soluções antimicrobianas

utilizadas como irrigantes intracanaís durante o preparo biomecânico, promovem redução microbiana, apesar de um grande número de microrganismos ainda serem observados.

Siqueira *et al.* (2007) avaliaram *in vivo* a redução microbiana após o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% e 7 dias após o uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Onze canais radiculares de dentes humanos com infecção primária e presença de lesão periapical foram utilizados. Na coleta após o preparo químico-mecânico 45,5% dos canais radiculares apresentaram cultura positiva. Após o uso do hidróxido de cálcio 18,2% dos canais radiculares apresentam crescimento microbiano. Os resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre o uso e o não uso do hidróxido de cálcio. Entretanto, maior número de canais cultura negativa foram encontrados após o uso da medicação por 7 dias.

2.3 ANTIBIÓTICOS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Antibióticos são auxiliares quimioterápicos que ajudam as defesas do hospedeiro na eliminação de microrganismos que, pelo menos temporariamente, as tenham superado. Antibióticos são recomendados nos casos de infecções endodônticas, apenas quando infecções periapicais agudas apresentam sinais de disseminação do processo infeccioso, tais como febre, tumefação, celulite e mal estar. Nestes casos a terapia antibiótica é indicada em associação com o debridamento do sistema de canais radiculares e a drenagem de tecidos moles ou duros, a fim de prevenir conseqüências mais sérias que poderiam advir da disseminação da infecção (Baumgartner, 2006).

O uso de antibióticos no tratamento endodôntico, segundo recomendações da *American Heart Association*, está indicado para pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, quando submetidos à instrumentação além do ápice dentário, cirurgia perirradicular e reimplante de dentes avulsionados (Dajani *et al.*, 1997). De acordo com a *American Heart Association*, as condições cardíacas são classificadas em alto risco e risco moderado. São considerados altos riscos: válvulas cardíacas protéticas, endocardite bacteriana prévia, condutos pulmonares sistêmicos construídos cirurgicamente, e doenças

cardíacas cianóticas complexas, como estados ventriculares simples, transposição de grandes artérias e tetralogia de Fallot; já as consideradas de risco moderado, compreendem: a maioria das malformações cardíacas congênitas, disfunção valvular adquirida, cardiomiopatia hipertrófica, prolapso de válvula mitral com recurgitação valvular e/ou espessamento dos folhetos valvulares.

A dose profilática recomendado pela *American Heart Association* consiste na administração de 2g de amoxicilina para adultos e 50mg/Kg para crianças, em dose única, via bucal, uma hora antes do procedimento. Nos casos, de pacientes alérgicos à penicilinas, estes devem ser tratados com regime alternativo de clindamicina, 600 mg, via oral, uma hora antes do procedimento. Azitromicina e a claritromicina também são agentes alternativos para os pacientes alérgicos às penicilinas (Dajani *et al.*, 1997). Essas drogas são relacionadas quimicamente à eritromicina, mas possuem um nível sérico maior e mais prolongado, um espectro antibacteriano mais amplo, e causam menos efeitos adversos no trato gastrointestinal, quando comparados à eritromicina (Chambers & Sande, 1995; Andrade 1999).

2.3.1 Antibióticos de uso na Endodontia

PENICILINAS

As penicilinas, como um grupo, são os agentes antimicrobianos mais freqüentemente utilizados, e constituem a primeira opção como coadjuvante ao tratamento das infecções odontológicas leves e moderadamente severas (Andrade, 1999).

As penicilinas são compostos naturais e semi-sintéticos, com propriedades diferentes no que diz respeito à sua ação antibacteriana podendo apresentar pequeno ou largo espectro de ação biológica (Walker, 1992; Andrade, 1999).

Penicilinas naturais assim denominadas, pelo fato, de serem produzidas por fungo (*Penicillium notatum*). As penicilinas naturais são também conhecidas por

benzilpenicilinas ou penicilina G e são consideradas de pequeno espectro de ação, atuando principalmente sobre os seguintes microrganismos:

-Cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* não produtoras de beta-lactamases.

-Cocos anaeróbios Gram-negativos: *Neisseria* spp.

- Anaeróbios estritos Gram-positivos: *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*.

-Anaeróbios estritos Gram-negativos: *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. e algumas espécies de *Bacteroides* spp. (raramente atinge o *Bacteroides fragilis*).

As penicilinas naturais não agem contra espécies bacterianas produtoras de penicilinases (beta-lactamases), enzimas que tem a capacidade de destruir o anel beta-lactâmico de algumas penicilinas, inativando-as (Andrade, 2006).

As penicilinas naturais são muito mal absorvidas via bucal, por serem inativadas pelo suco gástrico. A meia vida plasmática das penicilinas G é muito curta (aproximadamente 20 minutos), sendo necessária administração de contínuas de altas doses para se manter níveis séricos adequados.

As penicilinas sintéticas são obtidas acrescentando precursores específicos ao meio nutritivo onde crescem os fungos produtores das penicilinas naturais, como é o caso da fenoximetilpenicilina potássica, mais conhecida como penicilina V, ou por meio de modificações da cadeia lateral do ácido 6-aminopenicilânico, gerando inúmeras outras penicilinas (Andrade, 2006).

Das penicilinas sintéticas, a ampicilina e seu análogo, a amoxicilina, são de maior interesse prático na odontologia, por não serem inativadas pelo suco gástrico, podendo ser administradas via bucal (Andrade, 2006).

As principais diferenças entre a ampicilina e a amoxicilina (derivada da própria ampicilina) são mais farmacocinéticas do que em relação ao espectro de ação. A amoxicilina é melhor absorvida por via bucal e não sofre modificações no organismo. Sua concentração no soro e nos tecidos é quase duas vezes maior do que as da ampicilina, o que

permite seu emprego de 8 horas ao invés de 6 horas. A amoxicilina é melhor tolerada pelo organismo, sendo menos comum a incidência de distúrbios gastrintestinais (Andrade, 2006).

A ampicilina e a amoxicilina são classificadas como penicilinas semi-sintéticas de espectro de ação estendido, por inibir a maioria das bactérias sensíveis às penicilinas G e V, e apresentar ação adicional contra bactérias Gram-negativas, especialmente espécies de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus mirabilis* (Moenning *et al.*, 1989; Walker, 1992; Baker, 1994).

Forbes *et al.*, em 1998, explicando o mecanismo de ação das penicilinas, relataram que o anel beta-lactâmico é a chave do modo de ação dessas drogas, pois se ligam a enzimas envolvidas no processo de síntese da parede celular, inativando-as. Um dos principais componentes dessa parede é a camada de peptidoglicano, cuja síntese ocorre em diversos estágios. Somente a última fase ocorre no exterior da membrana citoplasmática, e corresponde à polimerização dos aminoácidos para a formação de cadeias lineares, as quais vão se unir, através do processo denominado transpeptidação, para formar estrutura protéica final. Esse processo exige a participação de diversas enzimas. Evidências indicam que os antibióticos beta-lactâmicos inativam o processo de transpeptidação por ter afinidade de ligação com essas enzimas, o que resulta em uma ausência de ligação entre as cadeias de peptidoglicanos e uma falta de resistência à tensão, acarretando a ruptura da célula.

O principal mecanismo de resistência de bactérias às penicilinas é a produção de beta-lactamase pelas células bacterianas. As beta-lactamases são enzimas que têm a propriedade de destruir o anel beta-lactâmico de algumas penicilinas, e a estrutura alterada da droga não permite a ligação com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular, impedindo a sua ação bactericida (Walker, 1992; Forbes *et al.*, 1998; Andrade, 1999). A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos também pode ser adquirida quando as bactérias alteram o alvo onde antibiótico vai agir. Nesse mecanismo, o microrganismo muda, ou adquire de outro microrganismo, os genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular. Essas novas enzimas, derivadas de mutações genéticas, continuam suas funções mesmo na presença do antibiótico beta-lactâmico, geralmente porque esses não apresentam afinidade suficiente por essas enzimas. (Forbes *et al.*, 1998).

A benzilpenilicina (Penicilina G) pode ser administrada via bucal ou parenteral; apresentando maior eficácia quando administrada via parenteral. Esta droga atua sobre bactérias: a) Gram-positivas (estreptococos, estafilococos e pneumococos), especialmente os estafilococos que produzem a penicilanase, ou beta lactamase; b) Gram-negativas (os meningococos e genococos); bacilos Gram-positivos (os anaérobios Gram-positivos, isto é *clostridium tetani* e *C.perfringens* e bacilos antraz, porém *C. difficile* é resistente a penicilina) e c) espiroquetas (*T. vincentti* e *T.palladium*). São eliminadas via renal, possuem pico de ação de 20 a 45 minutos, com níveis séricos de 8 µg/ml e com meia vida de 2 h (Newman & Kornman, 1997).

A amoxicilina pode ser administrada via bucal, intramuscular ou endovenosa. Possui o mesmo espectro de ação das benzilpenicilinas, porém estendido para *Bordorela pertussi*, *Haemophylus influenzae*, *Salmonela Shigela*, *Proteus mirabilis* e *E. coli* (Gram-negativos). Apresenta seu pico de ação para uma dose de 800mg via bucal em 1 hora, com níveis séricos de 7 µg/ml e meia vida de 1,5 horas (Newman & Kornman, 1997).

A amoxilina + ácido clavulânico pertence ao grupo dos beta-lactâmicos, entretanto a adição do ácido clavulânico inibe a ação das beta-lactamases. Pode ser administrada via bucal ou injetável. Apresenta espectro de ação similar ao da benzilpenicilina com vantagem adicional de também ser efetivo contra anaeróbios e microrganismos comumente causadores de infecções respiratórias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophylus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*. É metabolizado nos rins e apresenta seu pico de ação para uma dose de 500 mg via bucal em 2 horas, com níveis séricos de 7µg/ml e meia vida de 1,5 horas (Newman & Kornman, 1997).

O ceflacor é uma cefalosporina de 2ª geração, pertence ao grupo dos beta-lactâmicos. As cefalosporinas inibem a síntese da parede celular, inibem também a divisão e o crescimento celular; com frequência ocorre a lise e a alongação das bactérias sensíveis à ação das cefalosporinas. Desenvolve sua ação preferencialmente sobre cocos Gram-negativos e bacilos, entretanto, menos efetivas contra estafilococos (Schellack, 2004). São utilizadas para combater infecções do trato respiratório e geniturinário, infecção da pele e tecidos moles. Pode apresentar efeitos colaterais como distúrbios gastrintestinais, náuseas, vômito e diarreia. Reações dermatológicas por hipersensibilidade. Infecções oportunistas

por microrganismos não suscetíveis (candida, pseudomonas). Sua administração é da via bucal, sua excreção é via renal. Apresenta níveis séricos máximos de 17 µg/ml, é rapidamente absorvida, eliminada do sangue em 8 horas e com meia vida de 40 minutos. Cerca de 60% é excretada inalterada na urina em 2 horas (Newman & Kornman, 1997).

MACROLÍDEOS

Os macrolídeos apresentam ação bacteriostática, agem inibindo a síntese protéica, através da ligação às subunidades 50S dos ribossomos (Walker, 1992; Andrade 1999). É um grupo de antibiótico que se caracteriza estruturalmente pela sua estrutura química, a qual apresenta um anel lactônico de 15 átomos. A eritromicina faz parte deste grupo de antibióticos. É uma droga que apresenta espectro de ação similar ao das penicilinas G e V, com ação contra a maioria dos cocos Gram-positivos (Moening *et al.*, 1989; Sands *et al.*, 1995). A maioria das bactérias Gram-negativas apresenta resistência intrínseca a eritromicina, devido a sua incapacidade de penetrar no complexo membrana externa e parede celular. A resistência adquirida pode ser mediada por plasmídeos que codificam uma alteração no sítio de ligação na subunidade 50S ou por enzimas que inativam a eritromicina (Walker, 1992). É uma alternativa satisfatória à penicilina, em casos de pacientes alérgicos.

A azitromicina, devido a sua diferença estrutural, apresenta um espectro de ação aumentado quando comparado à eritromicina (Chambers & Sande, 1995; Andrade 1999). Segundo FAAS (1993), a azitromicina se apresenta mais ativa contra espécies Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae* e *Fusobacterium* spp., e alguns bacilos entéricos Gram-negativos, o que presumivelmente se deve a uma melhor penetração da droga através da membrana externa e parede celular. Porém, segundo o autor, a azitromicina é menos ativa que a eritromicina contra os microrganismos Gram-positivos, especialmente *Streptococcus* spp., e *Enterococcus* spp. As duas drogas apresentam atividade equivalente contra *Staphylococcus* spp. e bactérias anaeróbias Gram-positivas. A vantagem desta droga, em relação aos demais macrolídeos, é a sua administração única ao dia.

LINCOSAMINAS

As lincosaminas atuam na síntese protéica, dificultando a tradução da informação genética que permite essa síntese. Todas as reações químicas que ocorrem nas células são catalisadas por enzimas específicas. Essas enzimas são proteínas cuja estrutura é determinada pela informação contida no DNA do microrganismo, que vai ser convertida, através do processo de tradução genética, em uma proteína funcional. Esses antibióticos inibem a síntese de proteína fixando a subunidade 50S dos ribossomos, impedindo a ligação do t-RNA (ácido ribonucléico-transportador). Geralmente são drogas bacteriostáticas, ou seja, impedem o crescimento e a reprodução bacteriana (Walker, 1992; Andrade 1999); porém em altas concentrações exercem ação bactericida.

A clindamicina é a única droga do grupo das lincosaminas, que possui indicação na odontologia e constitui um dos antibióticos mais eficazes contra infecções odontogênicas sérias (Moening *et al.*, 1989; Baker, 1994; Grad 1997; Andrade 1999). Devido ao seu uso estar associado a efeitos adversos sérios, como a colite pseudomembranosa (Gill & Pallasch, 1981), a clindamicina deve ser reservada para infecções odontogênicas graves, anaeróbias, que não responderam adequadamente aos antibióticos de primeira escolha, normalmente às penicilinas (Walker, 1992; Andrade, 1999). A clindamicina apresenta um amplo espectro, de ação semelhante às penicilinas, é ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas, abrangendo espécies anaeróbias e facultativas, inclusive *Staphylococcus aureus* e outras espécies produtoras de beta-lactamases. A clindamicina é particularmente ativa contra quase todos anaeróbios Gram-negativos, incluindo *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* (Walker, 1992; Moening *et al.*, 1989; Sands *et al.*, 1995; Andrade 1999). Entretanto, *Clostridium difficile* sobrevive à ação da clindamicina (Groppo *et al.*, 2006).

NITROMIDAZÓLICOS

O metronidazol pertence ao grupo dos nitroimidazólico. É uma droga de baixo peso molecular, distribuída em quase todos os tecidos e fluidos do organismo, tendo poder bactericida. Possui espectro de ação contra protozoários e bactérias anaeróbias como *Fusobacterium* spp, *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp, *Peptostreptococcus* spp. e outros bacilos Gram-positivos. O metronidazol é efetivo apenas contra microorganismos anaeróbios estritos, portanto a associação com a penicilina G completa seu espectro de ação contra os enterococos (anaeróbios facultativos). Pode apresentar vários efeitos colaterais como náuseas, dores abdominais, gosto metálico, neutropenia reversível. Raramente podem ocorrer neuropatia periférica, convulsões disfunções cerebrais e reação ao álcool (tipo dissulfiram). O metronidazol é metabolizado nos rins. Sua administração é via bucal, apresenta níveis séricos de 12 µg/ml com 500 mg da dose apresenta meia vida de 8 horas (Newman & Konman, 1997).

2.3.2 Padrões de resistência aos antibióticos

Teste de suscetibilidade antimicrobiana para anaeróbios é realizado com pouca frequência nos laboratórios e centros médicos (Goldstein, 1995). Por consequência, os arquivos com padrões de resistência aos antibióticos são limitados à referências laboratoriais de estudos publicados, os quais pertencem à uma área isolada ou resultados de vários hospitais que geralmente reportam a suscetibilidade do grupo dos *B. fragilis* (Aldridge *et al.*, 2001; Snyderman *et al.*, 2002). Entre os estudos reportados, utilizando métodos estandarizados aprovados, uma variação na suscetibilidade é encontrada entre diferentes países, diferentes áreas geográficas dentro do mesmo país, e até mesmo entre os centros médicos da mesma cidade. Apesar destas variáveis nos resultados, algumas tendências surgiram, as quais tiveram um efeito direto nas recomendações para terapias empíricas com antibióticos.

PREVOTELLA, PORPHYROMONAS, FUSOBACTERIUM

No geral, dados a respeito da suscetibilidade de *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. são mais limitados quando comparado ao grupo dos *B. fragilis*. De forma geral, estes microrganismos são mais suscetíveis que o grupo dos *B. fragilis*. Aproximadamente 50% das espécies de *Prevotella* spp. são resistentes à penicilinas e ampicilinas devido a capacidade de produção de β -lactamase (Aldridge *et al.*, 2002).

Ao contrário da espécie *B. fragilis*, a maioria das espécies de *Prevotella* spp. são suscetíveis à piperacilina, cefoxitina, cefotetan e ceftioxime em 70 a 90% (Aldridge *et al.*, 2001; Koeth *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 1999; Matto *et al.*, 1999).

Espécies de *Porphyromonas* spp., apresentam menores intervalos de resistência quando comparado as *Prevotella* spp., variando entre 8% e 17%. O mecanismo de resistência está relacionado com a produção de β -lactamase (Handal *et al.*, 2005). Os dois gêneros são uniformemente suscetíveis à carbapenems, metronidazol, e cloramfenicol, e as associações dos inibidores β -lactâmicos- β lactamase (Aldridge *et al.*, 2001).

Resistência à clindamicina tem sido observada tanto por espécies de *Prevotella* spp. (0-11%) quanto por *Porphyromonas* spp. (0-35%) (Aldridge *et al.*, 2001; Koeth *et al.*, 2004). Resistência à clindamicina pelas espécies de *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp., estão associadas a presença do gene *ermF* ou *ermG* (Roberts, 2003).

Resistência à tetraciclina pela espécie de *Prevotella* tem sido relatada em 50% , associada a presença de *tet(Q)*, *tet(M)* e *Tet(W)* via mecanismo de proteção ribossomial e *tet(Q)* têm sido identificado nas espécies de *Porphyromonas* (King *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000; Arzese *et al.*, 2000; Roberts, 2005). Transferência de resistência à tetraciclina entre as espécies de *Prevotella* spp. têm sido relatado via conjugação de transposons similar aos *Bacteroides* spp.; enquanto que a transferência de outros determinantes ainda é desconhecido (Scott *et al.*, 2000; McKay *et al.*, 1995).

A resistência das espécies de *Fusobacterium* spp. à penicilina permanece incomum (Johnson, 1993); porém, quando encontrada, está relacionada a presença de β -lactamase (King *et al.*, 1999). No geral, mais de 90% das espécies de *Fusobacterium* spp. são

suscetíveis à cefalosporinas e cefamicina, incluindo cefoxitin, cefotetan e ceftizoxime (Johnson, 1993; Nyfors *et al.*, 2003).

A resistência dos *Fusobacterium* spp. à tetraciclina têm sido reportada com maior frequência ao longo dos tempos, a qual está relacionada com a presença de *tet (W)* e *tet (M)* (Mckay *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 2000).

Peptostreptococcus

Até o momento, apenas “*Peptostreptococcus niger*” permanece no gênero dos *Peptostreptococcus*. Diversas outras espécies pertencentes ao gênero *Peptostreptococcus* foram reclassificadas em outros gêneros incluindo *Anaerococcus* spp., *Fingoldia* spp., *Micromonas* spp., *Peptoniphilus* spp. e *Peptostreptococcus* spp. (Song *et al.*, 2003). No geral, estes microrganismos apresentam resistência variada à penicilina: de 7 a 10%, à clindamicina: de 7 a 20% e ao metronidazol de 5 a 10%. Entretanto, apresenta maior suscetibilidade às associações dos inibidores β -lactâmicos- β -lactamases, cefalosporina, carbapenems e cloramfenicol (Baquero & Reig, 1992; Pelak *et al.*, 2002; Hoellman *et al.*, 2001; Brazier *et al.*, 2003).

Resistência entre *Peptostreptococcus* spp. à fluoroquilononas têm sido reportada em 14% à ciprofloxacina e 27%, à lexofloxacina (Aldridge, 2001; Koeth *et al.*, 2004).

Alterações nas proteínas ligantes aparentam contribuir com a resistência dos *Peptostreptococcus* spp. aos antibióticos β -lactâmicos. O gen *nimB* encontrado em duas cepas de *Finelgoldia magna*, parece estar relacionado com a alta resistência da espécie ao metronidazol. Apesar, de algumas espécies de cocos Gram-positivos que apresentaram o gen *nimB*, não foram resistentes ao metronidazol. (Handal *et al.*, 2005; Theron *et al.*, 2004).

2.3.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana estão indicados, de acordo com o *National Comitee for Clinical Laboratory Standards- NCCLS*, nas seguintes situações: determinação do padrão de suscetibilidade dos microrganismos a novos agentes antimicrobianos; monitoriamento periódico dos padrões de suscetibilidade de bactérias dentro de uma área geográfica ou centro de saúde; auxílio ao tratamento de pacientes em casos de fracassos de terapia medicamentosa ou infecções persistentes, em casos de espécie resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados; na ausência de terapêutica comprovada para uma infecção em particular e da severidade da infecção (Finegold *et al.*, 1998).

Diversos são os métodos laboratoriais para testar suscetibilidade antimicrobiana, porém é necessário levar em consideração a precisão destes métodos e suas correlações com os achados clínicos.

O método epsilometer (E-test) é um teste comercial baseado no princípio de gradiente de difusão em meio ágar como uma forma de determinar a concentração mínima inibitória (MIC). Este consiste de uma fita plástica de 50mm de comprimento e 3mm de largura, contendo gradientes de antibiótico de um lado e uma escala interpretativa do outro. A fita do E-test pode detectar uma CIM (concentração inibitória mínima) que varia de 0,016 a 256 µg/ ml, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993). Este teste de suscetibilidade é realizado posicionando a fita do antibiótico na superfície do ágar inoculado com o microrganismo a ser testado. Em seguida, a placa é incubada em aerobiose ou anaerobiose, de acordo, com o requerimento gasoso do microrganismo. Após incubação, a elipse de inibição formada em volta da fita é interceptada em um ponto, no qual a concentração mínima inibitória do antibiótico é determinada na escala interpretativa.

O E-test difere dos demais testes comerciais devido à flexibilidade na seleção da droga. É um método simples e de fácil interpretação dos resultados (Citron *et al.*, 1991; Ngui-Yen *et al.*, 1992; Le Goff *et al.*, 1997). Para a maioria das combinações antibiótico-

bactéria, a elipse formada é clara, com CIM bem definida (Citron *et al.*, 1991; Bolmström, 1993); entretanto, uma de suas limitações se dá pelo custo.

O método de macro e micro-diluição são métodos com finalidades similares ao método de diluição em ágar (Wexler *et al.*, 1991). Entretanto, kits comerciais de microdiluição não são encontrados com disponibilidade em muitos laboratórios clínicos e a seleção de antibióticos depende dos fabricantes, dificultando a seleção dos antibióticos. Além do mais, estes métodos nem sempre refletem um intervalo apropriado das drogas prescritas nas infecções anaeróbias.

O método de diluição em ágar é um procedimento referendado e recomendado pela NCCLS (2007) apesar de não estar indicado para laboratórios de pequeno porte. Este método é apropriado para os laboratórios de grande porte para o descobrimento de novas drogas e para confirmar resultados obtidos pelo método de leitura. Ênfase deve ser dada ao seu uso correto, o qual merece atenção. Estudo demonstra que variações no pH produzem modificações na atividade de alguns antibióticos como imipenem, piperacilina-tazobactam e ciprofloxacina (Falagas *et al.*, 1997). A avaliação de novos macrolídeos no tratamento de infecções orais e respiratórias por este método, deve se atentar para a variação dos pHs na determinação da concentração mínima inibitória.

Já o método de difusão em ágar, consiste no uso de discos de papel ou outros recipientes contendo uma determinada concentração de agentes antimicrobianos, que são colocados na superfície de uma placa inoculada com bactérias. O agente antimicrobiano se difunde no ágar e forma um gradiente de concentração ao redor do disco e, após a incubação, o diâmetro da zona de inibição é medido em milímetros e, obedecendo a um critério de interpretação, classificado em suscetível ou resistente. Este método é prático e conveniente para testar várias substâncias contra bactérias (Aldrige, *et al.*, 1990; Bianchini *et al.*, 1999). Porém, uma das grandes desvantagens deste método é não determinar a CIM, impossibilitando conhecimentos mais precisos quanto ao grau de resistência ou suscetibilidade da bactéria. Esse também não é um método aceitável para microrganismos de crescimento lento (Finegold *et al.*, 1998; Rosenblatt & Gustafson, 1993; Wexler, 1993).

As efetividades dos agentes antimicrobianos usados clinicamente foram avaliadas por vários autores, utilizando diversos métodos, como E-test, método de diluição e difusão

em ágar. Seguem em ordem cronológica alguns desses trabalhos, na busca de um melhor resultado terapêutico.

2.3.4 Suscetibilidade antimicrobiana de espécies isoladas em infecções endodônticas pelo método E-test

Citron *et al.* (1991) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de 105 espécies de bactérias anaeróbias isoladas de amostras clínicas contra cefoxitina, cefotaxima, imipenem, pencilina, metronidazol e clindamicina comparando o método de E-test e o método de diluição em ágar. Os resultados mostraram que os dois métodos apresentaram correlação positiva em 78% e 86% entre uma diluição e em 89% e 97% entre duas diluições, após 24 horas e 48 horas de incubação respectivamente. Os autores afirmaram que o E-test é um método fácil de se utilizar e interpretar, pode ser utilizado para isolados individuais de pacientes, além de ser um método confiável realizado em laboratório para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias.

Nachnani *et al.* (1992) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de 60 cepas de patógenos periodontais pertencentes às espécies: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* e *Capnocytophaga* spp. aos antibióticos: clindamicina, metronidazol, tetraciclina, ciprofloxacina, cefoxitina e ampicilina através do E-test, utilizando o método de diluição em ágar como controle. Verificaram 100% de sensibilidade das cepas testadas aos antibióticos. Setenta e cinco por cento das cepas de anaeróbios facultativos testadas foram sensíveis ao metronidazol. Para os demais antibióticos testados, o índice de suscetibilidade variou entre 97% e 100%.

Couroux *et al.* (1993) avaliaram a suscetibilidade de 92 cepas, pertencentes as espécies de *Bacteroides* spp. e *Porphyromonas* spp., aos antibióticos: clindamicina, cefoxitina, imipenem e metronidazol comparando o método de E-test e diluição em ágar. Verificaram que a suscetibilidade dos dois testes foi equivalente para todos os

medicamentos testados, entretanto, para o imipenem, houve uma concordância dos dois métodos em 91,7%. Já para cefoxitina foi de apenas 67%.

Spangler *et al.* (1995) testaram a suscetibilidade de 201 anaeróbios estritos aos antibióticos eritromicina, azitromicina, claritromicina e roxitromicina através dos métodos de diluição em ágar (Oxyrase Agar) e E-test. Claritromicina foi levemente mais efetiva que os outros antimicrobianos testados, não existindo discordância entre os dois métodos. Duerden (1995) avaliaram a suscetibilidade antibiótica de 147 cepas de microrganismos anaeróbios, dentre elas 45 de *Clostridium* spp., 25 de *Peptostreptococcus* spp., 10 de *Propionibacterium* spp. e 67 bacilos Gram-negativos anaeróbios, para determinar a concentração inibitória mínima de metronidazol, penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, imipenem, eritromicina, clindamicina e tetraciclina. As espécies de *Propionobacterium* e 1 cepa de *Bacteroides fragilis*, 1 de *Prevotella buccalis* e 1 *Bacteroides ureolyticus* foram resistentes ao metronidazol (teste do disco). A maioria das cepas foi suscetível ao imipenem. Três cepas de *Clostridium* spp., 2 de *Peptostreptococcus* spp., todas as cepas de *Bacteroides* spp., e um terço das cepas de *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. foram resistentes à penicilina, no entanto todas foram sensíveis a amoxicilina + ácido clavulânico.

Vigil *et al.* (1997) estudaram o padrão de suscetibilidade de microrganismos isolados de 28 lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico aos antibióticos penicilina G, cefoxitina, cefotaxima, clindamicina, metronidazol, tetraciclina e eritromicina. Os microrganismos mais comumente isolados foram: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, “*Wolinella recta*”, *Fusobacterium* spp, *Clostridium* spp. Os autores utilizaram o E-test para avaliar a suscetibilidade dessas bactérias e concluíram que os resultados encontrados não deixaram evidências claras da resistência antibiótica significativa

Andrés *et al.* (1998) avaliaram a suscetibilidade de 143 espécies de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, e *Prevotella nigrescens* isoladas contra 18 agentes antimicrobianos (Penicilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, cefaloridina, cefalotin, cefamandole, cefotaxime, cefoxitin, cefuroxime, imipenem, piperacilina, eritromicina, oleandomicina, espiramicina, clindamicina, tetraciclina, metronidazol,

metronidazol-espíramicina). Todas as espécies de *P. gingivalis* foram suscetíveis aos antibióticos testados. Em contraste, 17% das cepas de *Prevotella* spp. foram resistentes aos β -lactâmicos, eritromicina, clindamicina, ou tetraciclina e portadores de genes resistentes, *ermF* ou *tetQ*, ou β -lactamases.

Carrasco *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* através do E-test a atividade antimicrobiana da amoxicilina, tetraciclina, azitromicina, ofloxacina e metronidazol contra 25 cepas clínicas de *Porphyromonas gingivalis*, 20 de *Prevotella intermedia* e 10 cepas de *Fusobacterium nucleatum* isoladas de bolsas periodontais. Todos os antibióticos testados exceto ofloxacina mostraram valores baixos de concentração inibitória mínima (MIC) para as cepas testadas (amoxicilina, tetraciclina e doxiciclina MIC₉₀ < 0,015 μ g/mL; metonidazol MIC₉₀ < 0,002 μ g/mL). Azitromicina foi eficaz contra *P. gingivalis*. Os autores concluíram que as cepas testadas neste estudo foram suscetíveis à tetraciclina, doxiciclina, metronidazol, ofloxacina e amoxicilina; e as cepas de *P. gingivalis* foram suscetíveis a azitromicina.

Poulet *et al.* (1999) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de 13 cepas de *Prevotella intermedia* ao metronidazol através do método de diluição em ágar e do E-test. A concentração mínima inibitória determinada pelo método de diluição em ágar foi 0,98 mg/L variando entre 0,25 e 2 mg/L. Já através do E-test, a concentração mínima inibitória foi 0,82 mg/L, variando entre 0,047 e 2 mg/L. Apesar do pequeno número de cepas avaliadas, foi demonstrada uma excelente atividade do metronidazol contra *P. intermedia*, sendo 100% das cepas suscetíveis a este medicamento.

Hecht *et al.* (1999) avaliaram a suscetibilidade antibiótica das *Bacteroides fragilis* (n=275), *B. thalaitomicron* (n=76), *B. vulgatus* (n=43), *B. distasonis* (n=33), *B. uniformis* (n=18), *B. ovatus* (n=13), *B. caccae* (n=6), *B. eggertii* (n=3), *Clostridium* spp. (n=64), *Prevotella* spp. (n=35), *Peptostreptococcus* spp. (n=32) e *Fusobacterium* spp. (n=17) aos antibióticos: clindamicina, cefotetan, cefotaxima, ceftizoxima, Ampicilina/sulbactam, Ticarcilina/clavulanato, Piperacilina/ Tazobactam, Imipenem, Piperacilina, Trovafloxacina, augmentin. Para o grupo dos *B. fragilis*, os antibióticos mais efetivos foram os β -lactâmicos/ β -lactamase agentes inibidores combinados, carbapenems, trovafloxacina e metronidazol. Já para o grupo dos demais *Bacteroides* spp., resistência aos antibióticos foi

muito menor, perceptível apenas nas espécies de *Clostridium* spp. (clindamicina e cephamicinas) e *Prevotella* spp.(clindamicina e piperacilina). Apesar da prevalência de resistência aos antibióticos entre os anaeróbios, a frequência dos testes de suscetibilidade antimicrobiana vem diminuindo.

Kuriyama *et al.* (2000a) determinaram a suscetibilidade antimicrobiana de 191 bacilos anaeróbios Gram-negativos isolados de 93 espécimes de pus coletados de infecções odontogênicas orais frente aos antibióticos- ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, cefmetazole, cefotaxima, imipenem, eritromicina, clindamicina, minociclina, levofloxacina e metronidazol. β -lactamase foi detectada em 35,6% das cepas de *Prevotella* spp. pigmentadas em negro e 31,9% das cepas não pigmentadas analisadas. Nenhuma cepa das demais espécies isoladas produziu β -lactamase. Ampicilina, cefazolina e cefotaxima mostraram atividade diminuída frente às cepas de *Prevotella* spp. produtoras de β -lactamase; enquanto que os antibióticos ampicilina/sulbactam, cefmetazole e imipenem continuaram ser efetivos contra tais cepas. Todos os antibióticos β -lactâmicos testados foram eficazes contra *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp. Eritromicina demonstrou atividade diminuída contra *Fusobacterium* spp. e *Prevotella* não-pigmentada. Clindamicina, minociclina e metronidazol foram potentes antibióticos contra os bacilos Gram-negativos anaeróbios testados. O presente estudo mostrou que cepas positivas para β -lactamase foram mais frequentemente encontradas na espécie de *Prevotella* spp. quando comparada as demais espécies de bacilos Gram-negativas anaeróbias isoladas. A efetividade de adicionar sulbactam a ampicilina foi demonstrada, assim como a diferença da atividade da cefalosporina contra cepas positivas para β -lactamase.

Lana *et al.* (2001) avaliaram a suscetibilidade de 54 espécies bacterianas anaeróbias estritas e 34 facultativas, incluindo *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Clostridium* spp. e *Peptostreptococcus* spp.. *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp. isoladas de 31 canais radiculares com polpa necrosada. As cepas foram testadas contra penicilina G, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina e eritromicina. Entre as espécies anaeróbias estritas testadas, 98,1% foram suscetíveis à penicilina G, 96,3% à amoxicilina; enquanto que a eritromicina e tetraciclina inibiram o crescimento de 59,3% e 92,6% das cepas, respectivamente. A

maioria das espécies *Veillonella* spp., *F. nucleatum* e *Peptostreptococcus* spp. foram resistentes à eritromicina; entretanto, a eritromicina foi eficaz contra 91,2% dos microrganismos anaeróbios facultativos. Metronidazol foi efetivo contra 96,3% e 50% dos anaeróbios estritos e facultativos, respectivamente.

Chan & Chan (2002) avaliaram a suscetibilidade antibiótica de espécies anaeróbias facultativas e estritas pertencentes à flora de infecção odontogênica: *Streptococcus* do grupo viridans (n=40), *Fusobacterium nucleatum* (n=35), *Prevotella intermedia* (n=29), *Peptostreptococcus micros* (n=27), *Eikenella corrodens* (n=24) e *Porphyromonas gingivalis* (n=23) frente aos antibióticos: ampicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefixima, cefalexina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, metronidazol, minociclina, tetraciclina, trovafloxacina. Resistência à ampicilina foi encontrada em altos níveis da concentração inibitória mínima (MIC) em aproximadamente 1/3 das espécies de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* e *Eikenella corrodens* isoladas (MIC \geq 8 μ g/mL). A amoxicilina foi mais eficaz do que a ampicilina. Mesmo com a incorporação de inibidores de β -lactamase à amoxicilina, as cepas mostraram resistência em mais de 10% de todas as espécies exceto do grupo dos *Streptococcus viridans* e *Porphyromonas gingivalis*. Tetraciclina e eritromicina foram consideravelmente menos ativas contra a maioria das cepas testadas, enquanto a minociclina e doxiciclina exerceram forte atividade antimicrobiana e foram capazes de inibir o crescimento em baixas concentrações. Entre todos os antibióticos testados, trovafloxacina aparenta ser uma droga promissora expressando alta atividade (MIC₉₀ \leq 1 μ g/mL), e foi considerada uma potente droga bactericida em infecções odontogênicas.

Sousa *et al.* (2003) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* isolados de abscessos periapicais através do método de E-test frente aos antibióticos penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. Todas as cepas testadas foram suscetíveis aos antibióticos testados.

Jacinto *et al.* (2003) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana das espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii* e os microrganismos produtores de

pigmentos negros isolados de canais radiculares de dentes sintomáticos e assintomáticos e presença de lesão periapical frente aos antibióticos amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, azitromicina, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, eritromicina e metronidazol. Todos anaeróbios estritos foram suscetíveis à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e cefaclor.

Baumgartner & Xia (2003) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de 33 e 65 cepas de microrganismos anaeróbios facultativos e estritos respectivamente isoladas de abscessos endodôntico frente aos antibióticos penicilina V, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, metronidazol e claritromicina. O percentual de suscetibilidade para 98 espécies foi: penicilina V: 83/98 (85%), amoxicilina: 89/98 (91%), Amoxicilina + ácido clavulânico: 98/98 (100%), clindamicina: 94/98 (96%) e metronidazol: 44/98 (45%). O metronidazol apresentou valores mais altos de resistência quando comparado aos demais antibióticos testados. Entretanto, quando utilizado combinado à penicilina V ou amoxicilina, a suscetibilidade aumentou em 93% e 99% respectivamente. Claritromicina demonstrou ser eficaz contra as cepas testadas, entretanto novas investigações devem ser consideradas.

Bahar *et al.* (2004) estudaram a produção de β -lactamase e resistência antimicrobiana de 72 espécies de *Prevotella* spp. e 48 de *Porphyromonas* spp. isoladas de diferentes amostras clínicas através de discos de nitrocefin e fitas de E-test contendo os seguintes antibióticos: benzilpenicilina, ampicilina + sulbactam, cefoxitina, clindamicina, metronidazol e imipenem. Foram testadas 19 cepas de *P. melaninogenica*, 18 de *P. intermedia*, 16 de *P. denticola*, 11 de *P. lescheii* e 8 cepas de *P. bivia*. A produção mais alta de β -lactamase foi encontrada em 68,4% nas cepas de *P. melaninogenica*. Adicionalmente, foram isoladas 33 cepas de *Porphyromonas asaccharolytica* e 15 de *P. gingivalis*, das quais nenhuma era produtora de β -lactamase. Os autores concluíram que visando a resistência antibiótica entre os anaeróbios, o perfil de suscetibilidade das cepas isoladas neste estudo de *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. vai contribuir para o estabelecimento de bases para o reconhecimento da resistência antimicrobiana.

Van Winkelhoff *et al.* (2005) avaliaram a resistência antimicrobiana dos patógenos periodontais *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

intermedia, *Fusobacterium nucleatum* e *Micromonas micros* frente aos antibióticos penicilina, amoxicilina e tetraciclina. Maiores valores de concentração mínima inibitória (MIC) foram encontrados para penicilina e ciprofloxacina nas cepas de *F. nucleatum*, para penicilina, amoxicilina e tetraciclina nas cepas de *P. intermedia*, para tetraciclina, amoxicilina e azitromicina nas cepas de *Micromonas micros*, para tetraciclina e ciprofloxacina nas cepas de *P. gingivalis*. Com base nas concentrações de “breakpoints” as cepas providas da Espanha mostraram maior resistência. *F. nucleatum* mostrou-se resistente à penicilina, amoxicilina e metronidazol; *Prevotella intermedia* à tetraciclina e amoxicilina e *A. actinomycetemcomitans* à amoxicilina e azitromicina. Não foi observada resistência das cepas de *P. gingivalis* da Espanha e Holanda à nenhum dos antibióticos testados. Os resultados deste estudo demonstraram que pode não ser possível utilizar um mesmo protocolo antimicrobiano para o tratamento de periodontite severa em toda União Européia.

Jacinto *et al.* (2006) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de *P. gingivalis* isoladas de 20 canais radiculares de dentes com abscesso frente aos antibióticos: Amoxicilina, Amoxicilina + ácido clavulânico, azitromicina, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina utilizando o método do E-test. Todas as cepas foram sensíveis a amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefaclor, clindamicina, benzilpenicilina, metronidazol e tetraciclina. Os valores mais baixos referentes a concentração inibitória mínima variaram entre 0,026-0,123 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para amoxicilina + ácido clavulânico e clindamicina. Os menores valores de MIC 90 foram observados para clindamicina (0,0064 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Uma cepa mostrou resistência à eritromicina e 8 foram resistentes a azitromicina. Os autores concluíram que a amoxicilina assim como amoxicilina + ácido clavulânico e benzilpenicilina foram eficazes contra *P. gingivalis*.

2.4 Endotoxinas

Lipopolissacarídeo, fator determinante de virulência nas espécies patogênicas, chamado de endotoxina, são moléculas presentes na superfície da membrana das bactérias

gram-negativas, as quais são secretadas em vesículas durante a fase de crescimento bacteriano ou liberadas durante a morte celular (Rietschel *et al.*, 1992).

As bactérias produzem LPS para se reproduzir, se proteger de agressões externas, para servir de arcabouço e até para diminuir a permeabilidade da membrana que pode ser a causa de maior resistência a determinados antibióticos (Rietschel & Brade, 1992).

O LPS representa a principal superfície antigênica, apresentando significância microbiológica e imunológica. Apesar da existência de algumas exceções, muitas espécies possuem formas ou arquiteturas constituídas de componentes específicos: uma porção medial- lípide A, uma porção distal ou externa- Antígeno O, e um núcleo- o “core”. (Luderitz *et al.*, 1981, Rietschel *et al.*, 1992). O antígeno O é a cadeia mais longa e a porção mais variável da molécula entre as espécies bacterianas, capaz de induzir uma resposta imunológica específica, com a produção de anticorpos específicos. O “core” tem constituição muito pouco variável, porém também pode induzir a formação de anticorpos específicos. Este é constituído de uma parte de açúcares e uma parte chamada KDO (2-keto-3-deoxioctano), que se liga ao lípide A, podendo inclusive, interferir na sua bioatividade (Rietschel *et al.*, 1992). O Lípide A é a porção efetivamente tóxica da molécula, causando respostas imunológicas específicas. É a porção menos variável do LPS entre as espécies bacterianas, constituída de duas moléculas de açúcares (glicosamina) modificada por fosfato (PO₄) e um número variável de cadeias de ácidos graxos, com 14 átomos de carbono (Rietschel *et al.*, 1992).

O efeito tóxico das endotoxinas é dependente da resposta do hospedeiro (Rietschel & Brade 1992, Santos *et al.*, 2000), podendo interagir com vários sistemas celulares e humorais, causando febre (ação no hipotálamo), neutrofilia (ação na medula óssea), proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), liberação de aminoácidos nos músculos, produção de interleucina-2 (ação nas células T) e a produção de anticorpos (ação nas células B).

Os LPS induzem as células de defesa do hospedeiro como granulócitos e principalmente macrófagos à produzirem mediadores químicos, como fator de necrose tumoral, interleucinas -1, 6 e 8, lipídios e radicais livres, altamente reativos. Existe um receptor nos macrófagos (CD14), ao qual a endotoxina se liga, onde fragmentos de “lípidio

A”, menos tóxicos, podem se ligar impedindo o “lípid A” de gerar a produção de mediadores químicos.

Várias pesquisas utilizaram LPS bacteriano *in vitro* e *in vivo* para verificar os seus efeitos biológicos.

Horiba *et al.* (1992) investigaram o consumo de C3 (proteína do sistema complemento) quando em contato com o LPS de *Porphyromonas endodontalis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* e com controle LPS de *E. coli* 0111:B4 (Sigma Co., ST. Louis, MO). Observaram que quanto maior as concentrações de endotoxina, maior o consumo de C3, não havendo diferença entre os 4 tipos de LPS bacteriano testados.

Ito *et al.* (1996) avaliaram as endotoxinas de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. coli* e uma forma sintética desta última espécie, quanto ao aumento de células clásticas, a partir de duas culturas de células de medula óssea. Apenas uma cultura propiciou o aumento representativo de células clásticas, em mesma quantidade para todos LPS testados, justificando assim o aspecto semelhante do “lípid A” nas moléculas de diferentes origens microbianas.

Tokuda *et al.* (2001) observaram em cultura de células pulpares que a produção de IL-6 é estimulada pelo LPS da *Prevotella intermedia*; mas sua produção pode ser inibida por outros mediadores químicos. A IL-6 é uma citocina multifuncional produzidas por várias células e desempenha um papel central nos mecanismos de defesa do hospedeiro, na hematopoiese e na resposta imune.

Ko & Lim (2002) observaram a produção dos fatores MIP-1 α e MIP- β (“macrophage inflammatory protein”), fatores ativadores de macrófagos, os quais são produzidos por neutrófilos polimorfonucleares quando em contato com LPS de *P. endodontalis* e de *E. coli* 0111:B4. LPS de *E. coli* estimulou maior produção de MIP do que LPS de *P. endodontalis*; no entanto ambas podem desempenhar um papel crucial na inflamação.

Com relação ao efeito sobre tecidos ósseos, Pelt *et al.* (2002) observaram que LPS de *Prevotella intermedia* em cultura de osteoblastos de rato inibiu formação óssea pela redução da fosfatase alcalina e a incorporação de cálcio, e induziu a liberação de óxido

nítrico, IL-6 e pro-formas de metaloproteinases, de maneira que o referido LPS, não participa somente da reabsorção óssea, mas também inibindo a sua formação.

Holand *et al.* (2003) avaliaram o efeito do LPS de *E. coli* em cultura de células indiferenciadas da polpa, de odontoblastos e de macrófagos. Quantificaram os mediadores químicos produzidos e encontraram que nas concentrações de LPS de 10 a 80 µg/mL os macrófagos produziam IL-1, TNF- α e prostoglandina E2; nenhum dos outros tipos celulares produziram níveis significantes de mediadores para se diferenciar dos controles que não receberam LPS, reafirmando assim o efeito dos LPS sobre macrófagos.

2.4.1 LPS – Enterobactérias x Bactérias orais

O interesse na diferença da resposta do hospedeiro ao LPS gerou uma expansão de pesquisas utilizando microrganismos não-entéricos, resultando em observações significantes. Por exemplo, na microbiologia oral, estudos anteriores reviram (Mansheim *et al.*, 1978; Fujiwara *et al.*, 1990), e estudos mais recentes confirmaram (Darveau *et al.*, 1995; Pulendran *et al.*, 2001) o fato de que o LPS bacteriano e sua porção isolada “lípid A” obtidos de bactérias orais Gram-negativas anaeróbias, não ativam a resposta do hospedeiro de uma forma consistente, como a resposta clássica observada pela endotoxina de *E. coli*.

Estudos mais recentes, examinando o efeito letal em ratos causados por LPS bacterianos de bactérias orais Gram-negativas anaeróbias, observaram que estes foram significantemente reduzidos em potência, quando diretamente comparada ao LPS enterobacteriano (Takada & Galanos, 1987; Isogai *et al.*, 1988); e não induziram reação de Schwartzman (Mansheim *et al.*, 1978; Fujiwara *et al.*, 1990), uma resposta inflamatória sistêmica associada a endotoxina do tipo *E. coli* (Takada & Kotani, 1992). Estas observações revelam que este tipo de LPS apresenta nenhuma ou muita baixa atividade biológica. Esta baixa atividade pode estar relacionada ao número de grupo dos fosfatos ou dimensões alteradas e, posição dos ácidos-graxos presentes no “lípid A” de certas bactérias orais quando comparada com as entéricas, como no caso da espécie *E. coli*, a qual vem sendo comprovada ser crítica na indução da reação de Schwartzman (Takada &

Kontani, 1989). Apesar da baixa atividade da *P. gingivalis*, de fato, esta apresenta atividade biológica significativa.

Inúmeros estudos *in vitro* (Darveau *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996, 1999; Mansheim *et al.*, 1978; Ogawa *et al.*, 1994; Ogawa & Uchida, 1996) confirmaram que o LPS da *P. gingivalis* é menos potente, entretanto mais importante por eleger um padrão diferenciado de mediadores inflamatórios nas células imunes da resposta inata (Ogawa & Uchida, 1996) quando comparada diretamente ao LPS da *E. coli*.

Além deste fato, também foi reportado que células dendríticas, no reconhecimento e na resposta ao LPS da *P. gingivalis* e *E. coli* são significativamente diferentes, caracterizadas pela sinalização *TLR4* (“Toll Receptor 4”) alterada, produção de partes de citocinas separadas e diferentes na ativação *in vivo* da resposta imune adaptativa (Pulendran *et al.*, 2001).

2.4.2 LPS nos canais radiculares

Limulus ameocyte lysate (LAL), é o teste mais sensível e específico disponível para a detecção e medida de endotoxina provenientes das bactérias gram-negativas (Novitsky, 1994). Este tem sido utilizado para quantificar pequenas concentrações de endotoxinas em canais radiculares infectados (Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007). O método baseia-se na reação entre a endotoxina e um componente protéico do LAL produzindo um gel opaco facilmente reconhecido. A formação do gel indica que existe uma quantidade de endotoxina na amostra que é igual ou superior que a sensibilidade do LAL utilizado. O teste utiliza um corante sintético, o qual permite a detecção e quantificação de endotoxina cromogenicamente através do leitor de Elisa.

Dahlén & Bergenholtz (1980) avaliaram a atividade tóxica das endotoxinas em 13 canais radiculares com polpas necrosadas através do lisado de *limulus*. Os autores encontraram correlação entre a atividade de endotoxina e o número de bactérias Gram-negativas.

Horriba *et al.* (1990) coletaram amostras de 30 dentes com necrose pulpar com objetivo verificar possíveis correlações entre a presença de endotoxina e sintomas clínicos ou presença áreas radiolúcidas em canais radiculares infectados. Os autores concluíram que o conteúdo de endotoxina foi maior em dentes sintomáticos. Dentes com áreas radiolúcidas periapicais e dentes com exsudação apresentaram maior concentração de endotoxinas, quando comparado à ausência dos mesmos.

Khabbaz *et al.* (2000) investigaram a presença ou ausência de endotoxina, quantificaram endotoxina e associaram a presença de endotoxina com dor aguda de origem pulpar em 24 amostras coletadas da superfície da lesão cáriosa em 9 molares e 15 pré-molares com pulpite irreversível e reversível. Os dentes foram divididos em 3 grupos: sintomáticos com presença de lesão cáriosa (n=9), assintomáticos com presença de lesão cáriosa (n=11) e grupo controle sem cárie (n=4). A quantificação da endotoxina foi realizada através do teste LAL. Os resultados indicaram a presença de endotoxina em valores mais elevados nos casos sintomáticos, valor médio de 0,15773 ng/mL, quando comparado aos casos assintomáticos, com valor médio de 0,10723 ng/mL. Os dentes do grupo controle estavam livres da presença de endotoxina. Nos dentes sintomáticos (pulpite irreversível), foi encontrada endotoxina na superfície e nas camadas mais profundas de cárie, nos respectivos valores 0,15078 e 0,12111 ng/mL, o qual foi significativamente maior na superfície do que em profundidade. Nos dentes assintomáticos, a concentração de endotoxina presente na superfície e em camadas mais profundas de lesões cárias foram detectadas nos valores de 0,122091 e 0,07163 ng/mL respectivamente. Os resultados também demonstram que a concentração de endotoxina foi maior na superfície de dentes sintomáticos com lesão cáriosa quando comparado aos dentes assintomáticos (0,15078 e 0,12091 ng/mL, respectivamente). Similarmente, maior quantidade de endotoxina estava presente em camadas profundas das lesões cárias de dentes sintomáticos quando comparada aos dentes assintomáticos (0,12111 e 0,07163 ng/ mL, respectivamente). Os autores concluíram com o estudo que endotoxina estava presentes em lesões cárias de dentes sintomáticos e assintomáticos. A quantidade de endotoxina foi significante maior na superfície do que em camadas profundas da dentina cariada. A maior concentração de endotoxina estava presente nos casos sintomáticos quando comparado aos assintomáticos.

Laghios *et al.* (2000) realizaram estudo *in vitro* com o objetivo de estabelecer evidências de infiltração apical por LPS de um patógeno bucal (*Porphyromonas gingivalis*). Dez canais radiculares foram instrumentados/ seccionados nos 3 mm apicais, e obturados com guta-percha. Em seguida, os dentes foram imersos em LPS. Alíquotas foram removidas cada dia e submetidas à análise por “slot-blot” para quantificar LPS infiltrado. Os resultados indicam que os dentes obturados apicalmente com guta-percha infiltraram, enquanto que LPS não foi detectado em dentes recobertos com duas camadas de esmalte. Os autores concluíram que dentes obturados com guta-percha podem permitir a infiltração por LPS de patógenos orais.

Fouad *et al.* (2001), com o objetivo de comparar a progressão de lesão periapical e expressão de citocinas moduladoras do osso (IL1-alfa , TNF-alfa , IL-4, IL6 e IL- 11) expôs a polpa de primeiros molares de ratos C3H/HeJ e BALB/c. Os canais radiculares foram inoculados com microrganismos orais dos próprios animais por 2, 4 ,6 e 8 semanas. Após o período de tempo preconizado, os dentes foram processados histologicamente e corados para imunohistoquímica, para posterior análise em microscópio, com o objetivo de dimensionar a área lesada. Dos resultados obtidos, não houve diferença estatisticamente significativa na progressão das lesões periapicais nas duas cepas de ratos em relação ao tempo. A coloração por imunohistoquímica revelou não haver diferenças estatisticamente significantes entre as duas cepas de ratos quanto ao nível de citocinas expressas. Expressão de IL-11 não mudou do nível controle em ratos BALB/c mas foi correlacionada com a expressão de IL-6 e IL-4 em ratos C3H/HeJ. Os autores concluíram que a baixa resposta ao LPS pode não ser significativa na patogênese das lesões periapicais e na expressão de citocinas, quando estas são induzidas por uma flora bucal não específica.

Buck *et al.* (2001) avaliaram *in vitro* os efeitos dos irrigantes endodônticos e do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano, através da técnica de espectrofotometria de massa e gás cromatográfico. Soluções aquosas de LPS foram misturadas aos irrigantes endodônticos por 30 minutos e ao hidróxido de cálcio por 5 dias. A inativação do LPS foi medida através da quantificação de ácidos graxos liberados. A água, EDTA, etanol, clorexidina 0,12% na forma líquida + hipoclorito de sódio 2,62% e o hipoclorito de sódio 2,62% demonstraram pequena ação sob o LPS. A aplicação de hidróxido de cálcio por 5

dias, assim como a exposição à mistura alcalina da clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio por 30 minutos, foram capazes de inativar moléculas de LPS, através da hidrólise de ligações de ésteres nas ligações de ácidos graxos do “Lipíde A”.

Khabbaz *et al.* (2001) investigaram a presença ou ausência de endotoxina em polpas de dentes com lesão cariosa, quantificaram endotoxina quando presente e, associaram sua presença com dor pulpar aguda. As amostras foram coletadas de 28 dentes com lesão cariosa (15 sintomáticos e 13 assintomáticos) e de 5 dentes sem cárie dental. Durante os procedimentos de coleta, as polpas foram pesadas e padronizadas (aproximadamente 8 mg). A extração de endotoxina foi realizada com fenol e água. As quantidades de endotoxinas foram determinadas através do teste LAL. Os resultados mostraram que a concentração de endotoxina nas polpas dos dentes com sintomatologia dolorosa foi em média 0,15773 ng/mL; já nos dentes sem sintomatologia, média foi em torno de 0,10723 ng/mL; e os dentes sem lesão cariosa, ou seja, os grupos controles estavam livres de endotoxina. A presença de endotoxina foi significante maior no grupo de dentes com sintomatologia. A presença de endotoxina nos tecidos periapicais de dentes com lesão cariosa indicam um papel importante nas doenças pulpares humanas, visto que há uma quantidade maior de endotoxina nas polpas com sintomatologia dolorosa.

Nelson-Filho *et al.* (2002) investigaram radiograficamente a região apical e periapical de dentes de cães contendo LPS de *E. coli*. Após a remoção da polpa de 60 pré-molares, os dentes foram divididos nos seguintes grupos experimentais: G1 (n=20) preenchidos com endotoxina, G2 (n=20) preenchidos com endotoxina e hidróxido de cálcio, G3 (n=20) preenchido com solução salina, e G4 (n=20) sem preencher com endotoxina e hidróxido de cálcio. Dez dentes foram utilizados o grupo controle. Após 30 dias foram observadas lesões periapicais similares nos grupos 1 e 4; e lâmina dura intacta nos grupos 2 e 3. Os autores concluíram que a endotoxina bacteriana foi capaz de causar lesão periapical visível radiograficamente, e que o hidróxido de cálcio foi capaz de neutralizar o LPS bacteriano.

Carratú *et al.* (2002) avaliaram o tempo necessário para ocorrer infiltração de bactérias e endotoxinas em dentes obturados pela técnica vertical e condensação lateral. Os espécimes preparados pelas duas técnicas alternativas foram expostos à contaminação por

saliva, na qual a infiltração foi avaliada com o passar do tempo. Nenhum dos espécimes foi infiltrado por endotoxina após 31 dias. Por outro lado, entre o dia 13 e 37 bactérias haviam infiltrado em todos os espécimes.

Tanomaru *et al.* (2003) utilizaram dentes de cães inoculados com LPS de *E. coli*, para avaliar o efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigantes e medicação intracanal de hidróxido de cálcio. Cento e quarenta raízes de pré-molares de 7 cachorros foram preenchidas com endotoxina de *E. coli* por 10 dias. Três canais foram perdidos durante o processamento histológico. As seguintes soluções irrigadoras foram utilizadas durante o preparo biomecânico: NaOCl 1% (n=20), 2,5% (n=19), 5% (n=29), clorexidina líquida 2% (n=20), solução fisiológica (n=19). Vinte dentes foram preenchidos com hidróxido de cálcio (Calen) após o preparo mecânico com solução salina. Após 60 dias, os animais foram sacrificados e os seguintes parâmetros foram avaliados: infiltrado inflamatório, espessamento do ligamento periodontal, reabsorção óssea e do cimento. Os resultados histopatológicos revelaram que os dentes irrigados com solução de hipoclorito de sódio 1% e solução fisiológica apresentaram maior infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal e maior reabsorção óssea e do cimento quando comparados com os dentes preenchidos com hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o preparo biomecânico com as soluções irrigantes não foi capaz de inativar os efeitos da endotoxina, entretanto, o hidróxido de cálcio em dentes de cães inativou os efeitos do LPS bacteriano.

Jiang *et al.* (2003a) visaram determinar os efeitos diretos do LPS bacteriano sobre a gênese de osteoclastos assim como a capacidade do hidróxido de cálcio em inibir a formação de osteoclastos estimulada pelo LPS. Células RAW 264.7 foram cultivadas e recombinada com receptor ativador do ligante (RANKL) NF-kB por 72 horas. Em seguida, RANKL foi removido, e as células foram tratadas com 0, 1, 10 ou 100 ng/mL de LPS, com hidróxido de cálcio ou 50 ng/mL de RANKL, como controle positivo, por mais 48 horas. As células foram fixadas e coradas com isotiocianato fluorescente para a detecção de de sítios ativos. Histoquímica foi realizada a fim de detectar células multinucleadas expressando acida-resistência à atividade da fosfatase ácida. Os autores concluíram que o LPS estimula diretamente a formação de “osteoclast-like cell” (OCL); e a neutralização do

LPS através do tratamento com hidróxido de cálcio, reduziu significativamente a capacidade de provocar a diferenciação de OCLs.

Jiang *et al.* (2003b), com o objetivo de investigar o mecanismo que predomina na destruição dos tecidos periapicais pelos componentes celulares das bactérias gram-positivas, peptidoglicanos (PGN) e componentes celulares das bactérias gram-negativas; células precursoras de osteoclastos RAW 264.7 foram cultivadas com 50ng/ml receptor ativador do PGN na presença ou ausência de várias concentrações de LPS bacteriano por 48 horas adicionais. RT-PCR foi utilizado para examinar a presença de receptores conhecidos nos osteoclastos envolvidos na mediação, na ativação em resposta a PGN (TLR2) e LPS (TLR4). Os resultados demonstraram que a dose dependente e reproduzida estimulou a formação de TRAP-positivo multinucleados de osteoclast-like (OCL). Estes resultados sublinham a importância de considerar tanto as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas ao interpretar achados associados a lesões periapicais primárias e secundárias.

Silva *et al.* (2004) avaliaram histologicamente a efetividade do preparo mecânico em 120 canais radiculares de 6 cães, inoculados com LPS bacteriano após pulpectomia e, posteriormente selados com óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram divididos em grupos de acordo com o irrigante utilizado: solução salina, hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e clorexidina 2% e grupo controle sem irrigante. Os animais foram sacrificados em 60 dias, os dentes foram fixados e desmineralizados. Subseqüentemente, foram realizados cortes seriados e corados pela técnica de Brown-Brenn para visualização de contaminação bacteriana. Os resultados demonstraram que o infiltrado inflamatório foi menos intenso nos grupos que continham hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 2%. Entretanto, nenhum dos irrigantes foi capaz de inativar por completo o efeito maléfico do LPS bacteriano. O preparo químico-mecânico associado a diferentes irrigantes não foi capaz de inativar o LPS bacteriano.

Hong *et al.* (2004) investigaram a ação do LPS bacteriano nos tecidos periapicais com relação à indução de reabsorção óssea. Polimixina B foi avaliada no tratamento das lesões periapicais. O LPS foi isolado de dois endodonto-patógenos, *F. nucleatum* e *P. endodontalis*. O LPS foi inserido em macrófagos de ratos (J744) para liberação de 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 significante estes efeitos. O LPS também estimulou a expressão gênica da metaloproteinase 1 (MMP-1) no J774. Os anticorpos anti IL-1 alfa e TNF-alfa apresentaram diminuição de seus efeitos. A administração de polimixina B reduziu as extensões de reabsorções ósseas e simultaneamente o número de fatores produtores de macrófagos MMP-1. Os autores concluíram que a liberação de LPS dos canais radiculares infectados estimula a síntese de IL-1 alfa e TNF-alfa pelos macrófagos. Estas citocinas pré-inflamatórias regulam a produção de MMP-1 pelos macrófagos, as quais induzem reabsorções periapicais.

Jacinto *et al.* (2005) investigaram a concentração de endotoxina em dentes com polpa necrosada e avaliaram possível relação entre a concentração de endotoxina e a presença ou ausência de sinais e sintomas. As amostras foram coletadas de 50 canais radiculares em dentes com necrose pulpar. A quantidade de endotoxina foi mensurada através do teste LAL. A quantidade de endotoxina presente nas amostras variaram entre 2,390 e 22,100 EUml⁻¹. O valor médio da concentração de endotoxina de pacientes com dor espontânea foi 18,540 EU/ ml⁻¹, enquanto que nos casos assintomáticos apresentaram valores inferiores, com média de 12,030 EUml⁻¹. Foram encontradas associações positivas entre a concentração de endotoxina e a presença de sintomatologia.

Schein & Schilder (2006) quantificaram endotoxina através do teste “limulus lysate” de amostras coletadas em canais radiculares de 40 dentes, dos quais foram divididos clinicamente nos seguintes grupos: dentes vitais e assintomáticos (n=10), dentes vitais e sintomáticos (n=10), dentes despolpados e assintomáticos (n=10) e dentes despolpados e sintomáticos (n=10); e radiograficamente: dentes com presença de lesão periapical (n=23) e ausência de lesão periapical (n=17). Os dentes vitais/ assintomáticos apresentaram menor média quando comparado aos dentes vitais/sintomáticos (0,007 e 0,075 µg Et/mL, respectivamente). Os dentes despolpados/ assintomáticos por sua vez, apresentaram maior concentração de endotoxina (0,192 µg Et/mL) quando comparados com os dentes vitais. Entre os dentes despolpados, os sintomáticos apresentaram maior concentração de endotoxina do que os assintomáticos (0,192 e 1,070µg Et/mL, respectivamente). Em resumo, os dentes com sintomatologia clínica e presença de lesão periapical apresentaram maior concentração de endotoxina.

Vianna *et al.* (2007) quantificou a presença de endotoxina em 24 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical antes (C1) e após a instrumentação com clorexidina gel 2% (C2), após soro fisiológico (C3), após o uso das medicações hidróxido de cálcio, clorexidina gel e sua associação (C4). Endotoxinas foram detectadas em 100% dos canais analisados com média geral equivalente a 151,6 EU/mL (C1), 53,66 EU/mL (C2), 84,93 EU/mL (C3) e 72,75 EU/mL (C4).

2.4.3 Limulus ameobocyte lysate (LAL- QLC 1000)

Em 1950, Frederik Bang observou que uma infecção por bactérias gram-negativas era capaz de resultar em coagulação intravascular no caranguejo ferradura, cientificamente denominado *limulus polyphemus* (Bang, 1953). Mais tarde, Levin & Bang demonstraram que a coagulação era causada pela ativação de inúmeras enzimas localizadas nas células sanguíneas (amebócitos) do *Limulus polyphemus* e que esta ativação era iniciada na presença de endotoxina (lipopissacarídeos) presentes na parede celular de bactérias gram-negativas.

Subseqüentemente, o LAL teste utilizando reagente de LAL preparado a partir do sangue do caranguejo demonstrou ser um dos métodos mais sensíveis e específicos para medir endotoxinas bacterianas.

O teste cromogênico introduzido em 1977, é uma modificação que permite a quantificação da concentração de endotoxina à ser determinada de acordo com a intensidade de coloração, ao invés da turbidez ou geleificação da reação.

O teste LAL possui uma série de reações enzimáticas as quais são ativadas na presença de endotoxina. Uma das últimas reações da cascata enzimática ocorre em função da ativação de uma pró-enzima de coagulação, na presença de endotoxina. Esta enzima de coagulação por sua vez age sobre o substrato cromogênico presente no teste LAL (cromophore), resultando em peptídeo + pNA (para-nitro-anilina), produzindo uma cor amarelada de diversas tonalidades, sendo a intensidade variada de acordo com a concentração de endotoxina presente nas amostras.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Analisar a microbiota endodôntica em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical (C1) e correlaciona-la com os sinais e sintomas clínicos.
2. Investigar mudanças microbiológicas após o preparo químico-mecânico (C2).
3. Investigar a presença de *Streptococcus*, *Candida* spp. e enterobactérias na saliva em similaridade com a ocorrência no canal radicular dos pacientes submetidos a terapia endodôntica.
4. Determinar *in vitro* a suscetibilidade antimicrobiana de alguns microrganismos identificados na infecção endodôntica primária.
5. Quantificar endotoxinas antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares correlacionando com a presença de sintomatologia clínica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microbiota na infecção endodôntica primária e na saliva

SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram selecionados 30 pacientes que compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-Brasil, os quais possuíam dentes unirradiculares indicados para a realização de tratamento endodôntico devido a necrose pulpar e presença de lesão periapical. Foram selecionados pacientes que não fizeram uso de antibiótico num período mínimo de 3 meses para não interferir com a microbiota dos canais radiculares; pacientes que não apresentavam dor espontânea e dentes com sondagem periodontal menor que 3 mm. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP – antes de participar da pesquisa (Apêndice 1). A seguir, foi realizada a avaliação do estado geral do paciente, exame clínico, radiográfico e testes de sensibilidade pulpar (frio).

PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

Antes da intervenção endodôntica foram realizados testes clínicos para avaliação do estado perirradicular do dente (Teste de percussão e palpação). Inicialmente, foram realizados bochechos com enxaguatório bucal - clorexidina 0,12%. Em seguida, os pacientes foram anestesiados localmente para posterior remoção de contaminantes coronários, tecido cariado e restaurações. O dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e foi isolado com lençol de borracha (isolamento absoluto). A seguir, realizou-se o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loctite,

SP) para evitar infiltração de saliva. A anti-sepsia do campo operatório (superfície externa da coroa, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato) foi realizada com *swabs* estéreis umedecidos primeiramente em H₂O₂ a 30% (v/v), e depois em NaOCl 5,25% por 30 segundos cada, subseqüentemente neutralizado com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Möller, 1966). A esterelidade do campo operatório após o protocolo de desinfecção foi checada por coletas realizadas da coroa dental antes da abertura coronária.

A fase de acesso coronário foi realizada em duas etapas operatórias. A água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com solução salina estéril e apirogênica. Brocas de alta rotação diamantadas estéreis/ apirogênicas (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C) foram utilizadas. Na primeira etapa operatória foi realizada a remoção dos contaminantes coronários (restaurações, tecido cariado, microrganismos). Na segunda etapa, realizada para a confecção da cavidade de acesso, nova broca estéril/ apirogênica foi utilizada. Após a confecção da cavidade de acesso, nova desinfecção foi realizada, e sua face interna foi checada quanto a esterelidade. Prosseguindo, com o completo acesso ao canal radicular com uma nova broca esférica diamantada estéril/ apirogênica.

COLETAS MICROBIOLÓGICAS E DE ENDOTOXINA

Coleta microbiológica da saliva

Para a coleta da saliva, os pacientes foram recomendados a permanecer em jejum e não escovar os dentes até pelo menos 2 horas antes do procedimento de coleta da saliva. Foi coletado 2 mL da saliva total (não estimulada) dos pacientes que foram submetidos ao tratamento endodôntico. A mesma foi armazenada em tubos de “eppendorfs” esterelizados e em seguida processadas laboratorialmente como descrito a seguir.

Coletas de endotoxinas dos canais radiculares

Foram coletadas amostras de endotoxinas provenientes de 30 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical avaliados pelo método de cultura. As coletas foram realizadas, anteriormente à coleta microbiológica, antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2).

Para a coleta inicial (C1) um único cone de papel apirogênico foi introduzido no canal radicular próximo ao comprimento aparente do dente, permanecendo em posição por um minuto, em seguida transferido para tubos apirogênicos com 6 esferas de vidro também apirogênicas. As amostras foram armazenadas a - 20 °C, como recomendado pelo fabricante. Após o preparo químico-mecânico (C2) procedeu-se com uma nova coleta (C2) utilizando um cone apirogênico introduzido no comprimento de trabalho (CT).

Coletas microbiológicas dos canais radiculares

As amostras foram coletadas no início da primeira intervenção endodôntica logo após a abertura coronária e da coleta inicial de endotoxina (C1) e após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares e da coleta final de endotoxina (C2).

As coletas para determinação quanto à presença e quantificação de endotoxinas foram realizadas previamente a coleta das amostras para identificação microbiana. Detalhes sobre a coleta serão descritos posteriormente na etapa de coleta das endotoxinas. As amostras dos canais radiculares para identificação microbiana foram coletadas utilizando 3 cones de papéis absorventes estéreis da marca Dentsply (Petrópolis, R.J.), os quais foram esterelizados em autoclave. Um cone de papel estéril foi introduzido próximo ao comprimento total do canal radicular (determinado pela radiografia pré-operatória), permanecendo nesta posição por 60 segundos sob fluxo contínuo de nitrogênio a fim de preservar a viabilidade dos organismos anaeróbios (Berg & Nord, 1973). Nos casos onde os

canais estavam secos, o mesmo foi umedecido com soro fisiológico, para assegurar uma amostra viável. O cone de papel absorvente, ao ser retirado do canal, foi imediatamente introduzido em microtubos plásticos de 1,5 mL do tipo “ependorf” contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGAI, procedendo a coleta com mais 2 cones de papel da mesma forma. Amostra inicial do canal radicular foi transportada para o laboratório de microbiologia da Endodontia da FOP-UNICAMP e imediatamente colocado na cabine de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) para posterior processamento laboratorial, o qual foi realizado imediatamente após o término do procedimento endodôntico.

PROCESSAMENTO LABORATORIAL E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Processamento laboratorial e identificação microbiana da saliva

No laboratório, a amostra foi agitada por 60 segundos no Agitador (MA 162-MARCONI, São-Paulo, Brasil) para facilitar a dispersão dos microrganismos. A seguir, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 utilizando “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK) e 50 µl foram plaqueados em meios seletivos de cada diluição em placas pré-reduzidas contendo:

- Placas contendo “M-enterococcus Ágar” para seleção de enterococcus foram incubadas em aerobiose a 35 ° C por 2 dias.
- Placas contendo “MacConkey Ágar” para seleção de enterobactérias foram incubadas em aerobiose a 35 ° C por 2 dias.
- Placas contendo “Mitis Salivarius Ágar” para seleção de streptococi e enterococcus foram incubadas em 5 a 10% de CO₂ a 35 ° C por 2 dias.
- Placas de ágar contendo “Sabouraud Dextrose Ágar”, para a seleção de leveduras foram incubadas aerobicamente a 26 ° C por 48 horas e 7 dias.

- Placas contendo “CHROMagar-Candida” para a seleção e identificação de espécies de *Candida* foram incubadas aerobicamente a 37° C por 1, 2 e 3 dias.
- Placas contendo 5% de sangue de carneiro + Brain Heart Infusion (BHI) agar (Oxoid, Basingstoke, UK), aerobicamente a 37°C, por 2 dias para permitir o crescimento de organismos isolados para posterior identificação.

Após a incubação, cada placa foi examinada e os diferentes tipos de colônia foram subcultivados em placas de BHI + 5% sangue de carneiro desfibrinado recém-preparados. As colônias foram selecionadas para a identificação inicial através das diferentes aparências nos meios ricos e seletivos. O reconhecimento morfológico das colônias foi feito de acordo com: tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade. As colônias puras foram inicialmente identificadas pela morfologia da coloração de Gram, requerimentos gasosos e habilidades de produzir catalase. A identificação das espécies foi realizada através dos testes bioquímicos padronizados, apropriados para identificação de cada espécie como descrito a seguir.

As placas contendo Sabouraud Dextrose Agar e CHROMagar-Candida, após inoculadas, foram incubadas inicialmente em aerobise, temperatura ambiente (± 25 °C) por 48 horas, sendo posteriormente incubadas aerobicamente a 37° C por 2 dias.

Identificação microbiana

- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os enterococcus (cocos Gram-positivos, catalase negativa).
- Api Candida (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para leveduras.
- API 20E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para Enterobacteriaceae.

Processamento laboratorial e identificação microbiana do canal radicular

Na cabine de anaerobiose, o tubo de eppendorf contendo a amostra inicial foi agitado por 60 segundos no Agitador (MA 162-MARCONI, São-Paulo, Brasil) para

facilitar a dispersão dos microrganismos. A seguir, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000 utilizando “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK). Foram inoculados 50 µl da amostra não diluída e das diluições em placas pré-reduzidas contendo “Fastidious Anaerobe Agar” (FAA - Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios (Hemina e menadiona), as quais foram incubadas em uma câmara de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, permitindo a detecção de microrganismos de crescimento mais lento. Em seguida, 50 µl das diluições foram inoculados em placas de Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) ágar sangue e incubadas aerobicamente a 37°C, por 2 dias, para permitir o crescimento de organismos anaeróbios facultativos e aeróbios. Diretamente dos microtubos plásticos contendo VMGA III com as amostras dos canais radiculares, foram inoculados 100 µl em placas contendo os meios seletivos- M-enterococcus, MacCkonckey Agar, Sabouraud Dextrose Agar, Mitis Salivarius Agar (Dfco™, B. D., Sparks, USA).

As amostras dos canais radiculares foram inoculadas e incubadas conforme descrito a seguir:

- FAA (Fastidious Anaerobe Agar) ágar-sangue acrescido de hemina (5 mg/L), e vitamina K (1 mg/L) a 37°C, aerobicamente, por 2 dias (aeróbios, anaeróbios facultativos e estrictos);
- FAA (Fastidious Anaerobe Agar) ágar-sangue acrescido de hemina (5 mg/L), e vitamina K (1 mg/L) a 37°C, aerobicamente, por 5 dias (aeróbios, anaeróbios facultativos e estrictos);
- FAA (Fastidious Anaerobe Agar) ágar-sangue acrescido de hemina (5 mg/L), e vitamina K (1 mg/L) a 37°C, aerobicamente, por 14 dias (aeróbios, anaeróbios facultativos e estrictos);
- Placas contendo 5% de sangue de carneiro + Brain Heart Infusion (BHI) ágar (Oxoid, Basingstoke, UK), aerobicamente a 37°C, por 2 dias para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

- Placas contendo “M-enterococcus Ágar” para seleção de enterococcus foram incubadas a 35 ° C por 2 dias.
- Placas contendo “Mitis Salivarius Ágar” para seleção de streptococi e enterococcus foram incubadas em 10% CO₂ a 35 ° C por 2 dias.
- Placas contendo “MacConkey Ágar” para seleção de enterobactérias foram incubadas a 35 ° C por 2 dias.
- Placas de ágar contendo “Sabouraud Dextrose Ágar”, para a seleção de leveduras foram incubadas em condições atmosféricas (25°C) por 2 dias e depois a 37° C por 7 dias.
- Placas contendo “CHROMagar-Candida” para a seleção e identificação de espécies de *Candida* foram incubadas a 37° C por 2 dias.

Após a incubação, cada placa foi examinada e os diferentes tipos de colônia foram subcultivados em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado recém-preparados. A seleção das colônias para identificação inicial foi realizada a partir das diferentes aparências no ágar, o que é facilitado pela adição de sangue. O reconhecimento morfológico das colônias foi feito de acordo com o tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no ágar e efeito no sangue (nenhum, hemólise parcial, hemólise completa) (Figura 1A). As colônias foram isoladas em duas placas recém-preparadas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Para determinação dos requerimentos gasosos, cada colônia foi inoculada em duas placas, sendo uma das placas incubada por 2 dias aerobicamente em estufa de CO₂ e a outra pelo mesmo período de tempo anaerobicamente (Figura 2B). Estas placas foram comparadas para determinar se os isolados eram anaeróbios facultativos ou estritos. As espécies que cresceram somente em anaerobiose foram incubadas em estufa de CO₂. Caso não houvesse crescimento, estas seriam consideradas anaeróbias estritas. A morfologia bacteriana foi confirmada após cada incubação através da coloração de Gram (Figura 1C). As colônias puras inicialmente identificadas pela morfologia da coloração de Gram, requerimentos gasosos e posteriormente por testes de complementares.

O teste de fluorescência em U.V. (Figura 1D) foi realizado a fim de identificar presumidamente espécies de *Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp. pigmentadas, diferenciando-as de demais microrganismos não pigmentados, em fase inicial de crescimento, ou seja de não pigmentação, através da reação de coloração obtida a partir da fluorescência. Resultados da fluorescência: *Porphyromonas asaccharolytica*-endodontalis (vermelho ou laranja), *P. gingivalis* (Não fluorescente); Pigmentado – *Prevotella* spp. (vermelho), Bacilo gram-negativo não-pigmentado (Não fluorescente ou pink, laranja, amarelo); *Fusobacterium* spp. (verde), *Veillonella* spp. (vermelho), *Eubacterium lentum* (Vermelo, não fluorescente), *Clostridium difficile* (verde), *C. innocuum* (verde) e *C. ramosum* (vermelho).

O teste de catalase (Figura 1E) foi realizado utilizando água oxigenada 15% H₂O₂, para diferenciar cocos gram-positivos aeróbios em *Staphylococcus* (catalase +) ou *Streptococcus* (catalase -).

O teste de oxidase (Figura 1F), foi realizado para diferenciar bacilos gram-negativos em fermentadores de glicose e não fermentadores, sendo positivo para o segundo.

Após a realização dos testes complementares, testes apropriados para identificação foram selecionados, como por exemplo, o teste rapid ID 32A (Figura 1G) para identificação de anaeróbios estritos.

Identificação microbiana

Os seguintes kits de identificação foram utilizados para a especificação primária dos organismos 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 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa).
- Api Candida (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para leveduras.
- RapID NH System (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus*.
- API 20E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para Enterobacteriaceae.

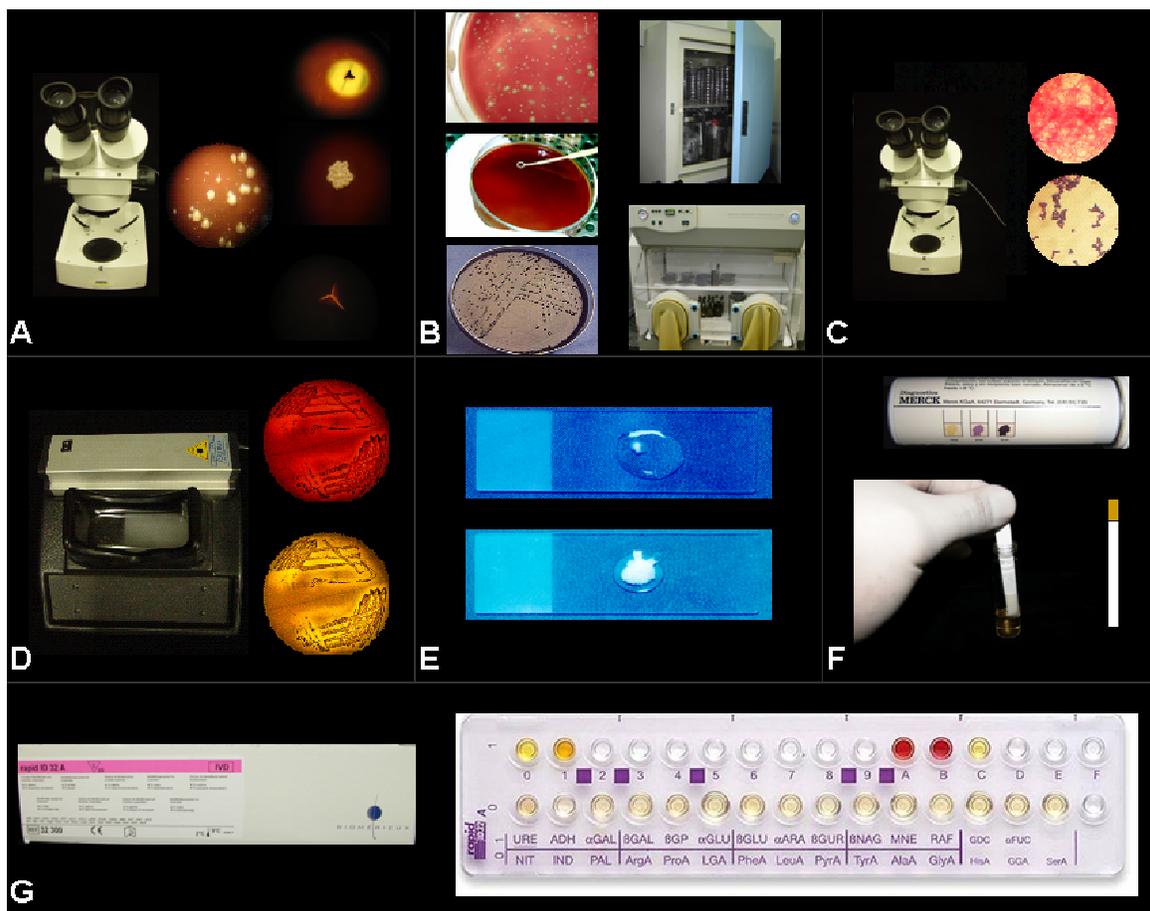


Figura 1. Etapas da identificação microbiana

A- Cultura primária/ análise microscópica, B- Isolamento bacteriano e determinação do requerimento gasoso, C- Classificação pela coloração de Gram, D- Teste de fluorescência em UV, E- Teste de catalase, F- Teste de oxidase, G- Teste bioquímico de identificação (rapid ID 32 A).

PROCEDIMENTOS ENDODÔNTICOS

Uma vez realizada a coleta microbiológica e de endotoxinas iniciais (C1). O preparo da entrada dos canais foi complementado com a realização dos desgastes compensatórios, utilizando a broca diamantada #3082 e as brocas de largo #2 e #3. A seguir foi realizada a patência dos canais empregando-se uma lima K #10 ou K #15 a dois milímetros do comprimento aparente do dente (CAD). O acesso cervical foi realizado com as limas Hero Rotatory Files. 10/20 (Micro-mega, Besançon, França), penetrando no máximo até 4 mm aquém do CAD ou assim que a progressão tornou-se difícil, o mesmo procedimento com a lima Hero Rotatory Files .08/20 (Micro-mega, Besançon, França) foi realizado. As limas Hero foram utilizadas em peça de mão acionada por motor elétrico (Endo Pro Driller, São Paulo, Brasil) com velocidade de 150 a 350 rotações por minuto (rpm). Em seguida foram utilizadas as brocas de Gates-Glidden #5, #4, #3 e 2 trabalhando até 2 mm aquém do comprimento preparado pelas limas Hero. Foi selecionada uma lima que melhor se adaptasse ao diâmetro anatômico do canal para determinação do seu comprimento até a constrição apical com o auxílio de localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel). Esta lima selecionada foi denominada lima anatômica inicial (LAI). Em seguida, realizou-se a patência do forame empregando lima K #10 ou K #15 no comprimento total do dente. O preparo apical foi realizado manualmente com K-file (Malleifer-Dentsply, Bailagues, Suíça). Em seqüência, realizou-se o recuo escalonado.

Durante o preparo químico mecânico (PQM), os canais foram preenchidos com hipoclorito de sódio 2,5% (Drogal farmácia de manipulação, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a cada troca de lima e recapitulados com a LAI. A irrigação foi realizada com 5 mL da solução de soro fisiológico estéril a cada troca de lima e recapitulados com a LAI. Para a segunda coleta (C2) de endotoxina e de identificação microbiológica realizada após o preparo químico-mecânico, os canais foram irrigados com 5 mL de tiosulfato de sódio (5%) durante 1 minuto para neutralização do hipoclorito de sódio (2,5%), posteriormente lavados com 5mL de soro fisiológico estéril. Após a realização da coleta (C2), os canais radiculares foram irrigados com EDTA à 17%, o qual permaneceu no interior dos canais radiculares

pelo menos 3 minutos (Teixeira *et al.*, 2005) e finalmente lavados com 3 mL de soro fisiológico estéril. Em seguida os canais radiculares foram secados com cones de papéis estéreis e obturados.

O procedimento restaurador de todos os dentes realizou-se através da colocação de 2 mm de CAVIT na embocadura dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, USA) e aplicação em camadas de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, USA).

4.2. Efeito dos agentes antimicrobianos sistêmicos sobre microrganismos

Para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas foi utilizado o método epsilometer (E-test).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Peptostreptococcus* (n=16), *Fusobacterium* (n=7), *Porphyromonas* (n=4), *Prevotella* (n=15) isoladas dos canais radiculares antes do preparo químico-mecânico (C1) foram testadas utilizando o método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia), frente aos agentes antimicrobianos: benzilpenicilina (PG), amoxicilina (AC), amoxicilina + ácido clavulânico (XL), clindamicina (CM), Cefaclor (CF), eritromicina (EM) Metronidazol (MZ) azitromicina (AZ) e cloranfenicol (CL).

Para o preparo do inóculo, após 24-48 h de incubação da espécie bacteriana em placas de FAA (Fastidious Anaerobe Agar) + sangue desfibrinado de carneiro (Figura 2A), as colônias bacterianas foram transferidas (Figura 2B) para o meio líquido “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB) e agitadas (Figura 2C), agitadas em seguida (Figura 2D) até atingir a turbidez equivalente ao padrão 1 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil), verificado no espectrofotômetro (MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2E).

Fitas de E-test foram removidas do congelador permanecendo em temperatura ambiente por cerca de 20 minutos (Figura 2F).

Placas contendo 4 mm de espessura de Brucella Agar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 1% de vitamina K + 0,5% de hemina (para bactérias anaeróbias estritas) foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura

foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de *swab* estéril, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test, que foram previamente removidas do congelador e já se encontravam a temperatura ambiente cerca de 20 minutos, foram distribuídas nas placas com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada (Figura 2G). O experimento foi executado em duplicata e sempre em fluxo laminar.

As placas contendo as bactérias foram imediatamente incubadas em câmara de anaerobiose (Figura 2H), a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂, e a leitura foi realizada após 24 e 48 h de incubação. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test (Figura 2I), considerando o ponto de inibição completo de crescimento.

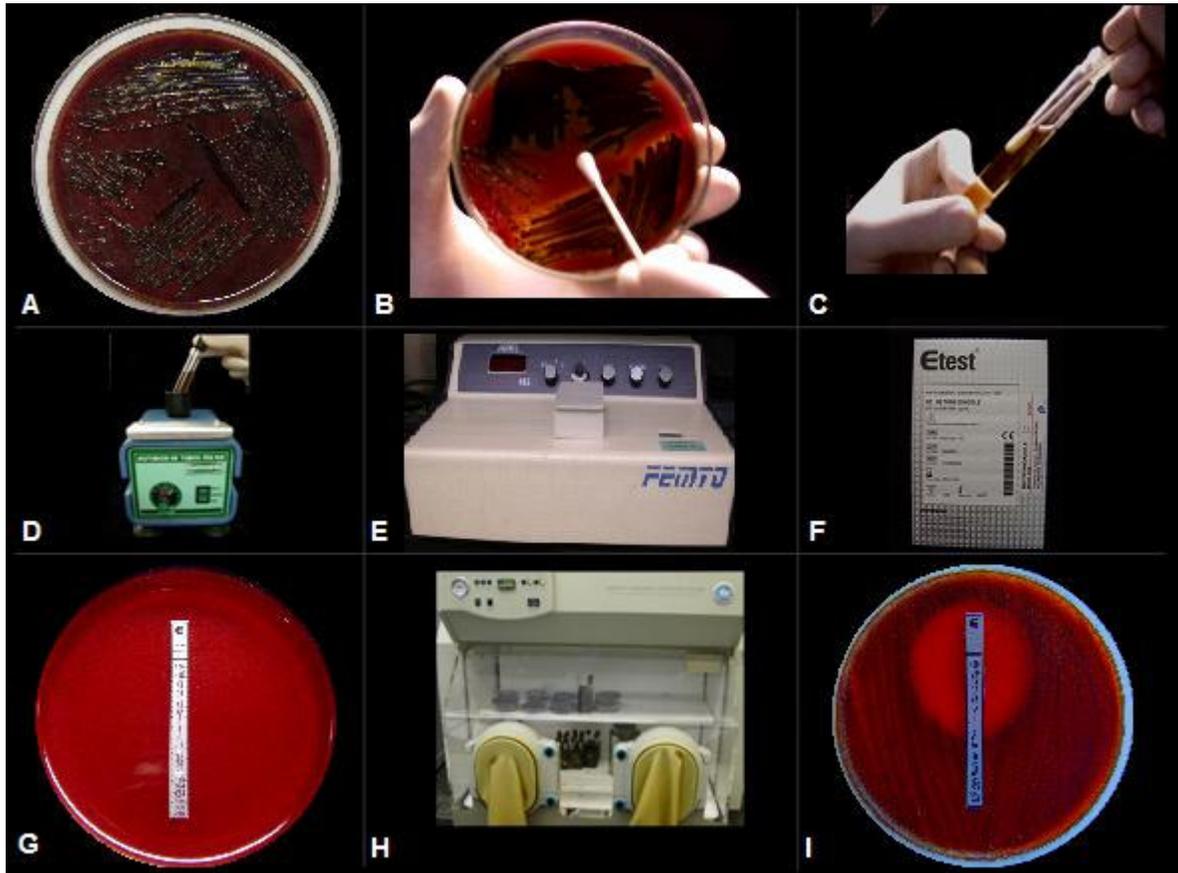


Figura 2- Procedimentos para realização do E-test

A - Cultura pura, B - Obtenção de colônias para preparo do inóculo, C - Preparo do inóculo bacteriano, D - Agitação do inóculo bacteriano, E - Verificação da turbidez no escrofotômetro, F - E-test, G - Fita do E-test na placa, H - Incubação na câmara de anaerobiose, I - Halo de inibição e elipse.

4.3. Quantificação de Endotoxinas dos canais radiculares

Para a quantificação de endotoxinas foi utilizado método LAL, que consiste em um Lisado de Amebócito de *Limulus* e um substrato corante sintético para detectar endotoxinas cromogenicamente (Quantitative Chromogenic LAL-1000, whittaker Bioproducts) (Figura 3A).

Para a realização do teste LAL foram utilizadas 24 amostras das 30 iniciais. Seis amostras foram perdidas durante as diversas fases de processamento laboratorial.

TESTE CROMOGÊNICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS LAL (QCL-1000, WALKERVILLE, MD, USA)

O kit utilizado QCL-1000 possui: a) 2 frascos (30 ml de água apirogênica); b) endotoxina liofilizada de *E. coli* (25 EU/ml) – reconstituída com 1ml de água apirogênica; c) 2 frascos (7mg) de substrato cromogênico liofilizado – reconstituídos em 6,5 ml de água apirogênica; d) 5 frascos de LAL liofilizado – reconstituídos em 1,4 ml de água (Figura 3B). O ácido acético 25% foi utilizado para paralisar a reação (“Stop reagente”).

Para quantificação da endotoxina presente nas amostras foram utilizadas placas de culturas de células (96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) apirogênicas (Figura 3C).

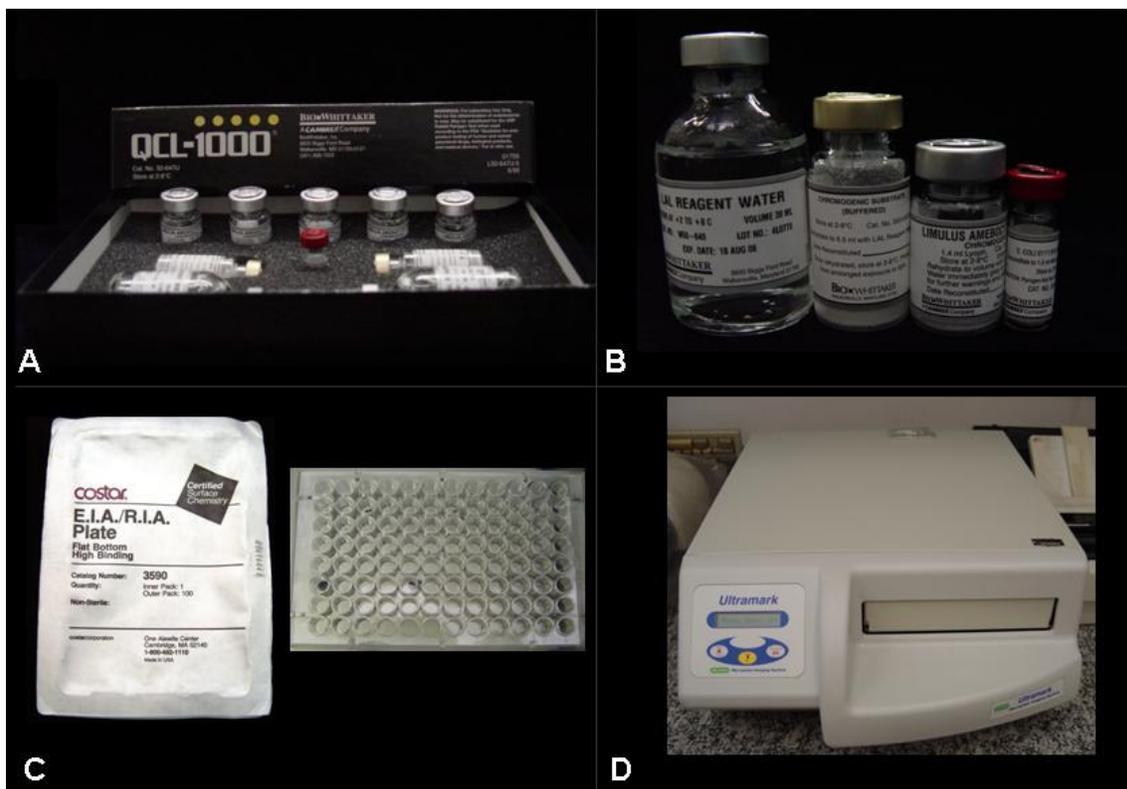


Figura 3. Componentes para quantificação de endotoxinas

A- Teste QLC-1000, B- Reagentes do teste QLC-1000, C- Placas 96 wells, D-Leitor de Elisa.

Todo material utilizado, proveniente da CAMBREX (WALKERVILLE, MD, USA) era apirogênico (livre de endotoxinas). De acordo com o manual da CAMBREX, os demais materiais utilizados para a realização da coleta de endotoxinas, foram esterelizados a 200 °C através de calor seco (estufa) por um período de 4 horas. As pinças clínicas, uma para cada coleta (C1 e C2), foram embaladas em papel alumínio e os frascos de vidro contendo 6 esferas de vidro, para armazenamento do cone de papel, foram selados com papel alumínio para evitar contaminação proveniente das tampas dos frascos que não podem ser submetidas a altas temperaturas por longo período de tempo, por serem de plástico. Os cones de papéis estéreis (Dentsply, Petrópolis, RJ) foram posicionados em frascos de vidros, selados com gaze e em seguida esterelizados utilizando calor seco como descrito acima.

PADRONIZAÇÃO DA CURVA PADRÃO

O estabelecimento de uma curva com quantidade de endotoxinas conhecidas é necessário para determinar a concentração de endotoxinas com quantidades desconhecidas (Figura 4).

Esta curva foi preparada utilizando soluções concentradas 1,0 EU/mL, 0,5 EU/mL, 0,25 EU/mL e 0,1 EU/mL como descrito na tabela abaixo (Tabela 2). A eficiência da curva padrão deve ser maior ou igual à 0,98, valor este denominado de r ($r \geq 0,98$).

Tabela 2. Estabelecimento da curva padrão nas concentrações 1,0 EU/mL, 0,5 EU/mL, 0,25 EU/mL, e 0,1 EU/mL. (* Potência de 25 EU/mL)

TUBO	Concentração de endoxina EU/mL	Solução estoque de endoxina (potência de 25 EU/mL)	Solução de endoxina padrão (tubo 1)	LAL água reagente
1	1,0	0,1 ml	-	25*-1/10 mL
2	0,5 mL	-	0,5 mL	0,5 mL
3	0,25 mL	-	0,5 mL	1,5 mL
4	0,1 mL	-	0,1 mL	0,9 mL

Tubo 1 : para preparar a solução de endotoxina padrão na concentração 1,0 EU/mL foi utilizado 0,1 EU/ml da solução estoque em 2,4 mL de LAL água reagente (25*-1/10 mL). A solução foi vigorosamente agitada por 60 segundos.

Tubo 2: 0,5 mL da solução do tubo 1 (1,0 EU/mL) foi colocada em 0,9 ml de LAL água reagente, resultado em uma concentração 0,5 EU/mL.

Tubo 3: 0,5 mL da solução do tubo 1 (1,0 EU/mL) foi colocada e 1,5 de LAL água reagente resultado em uma concentração 0,25 EU/mL.

Tubo 4: 0,1 ml da solução do tubo 1 (1,0 EU/mL) foi colocada em 0,9 ml de LAL água reagente, resultado em uma concentração 0,1 EU/mL.

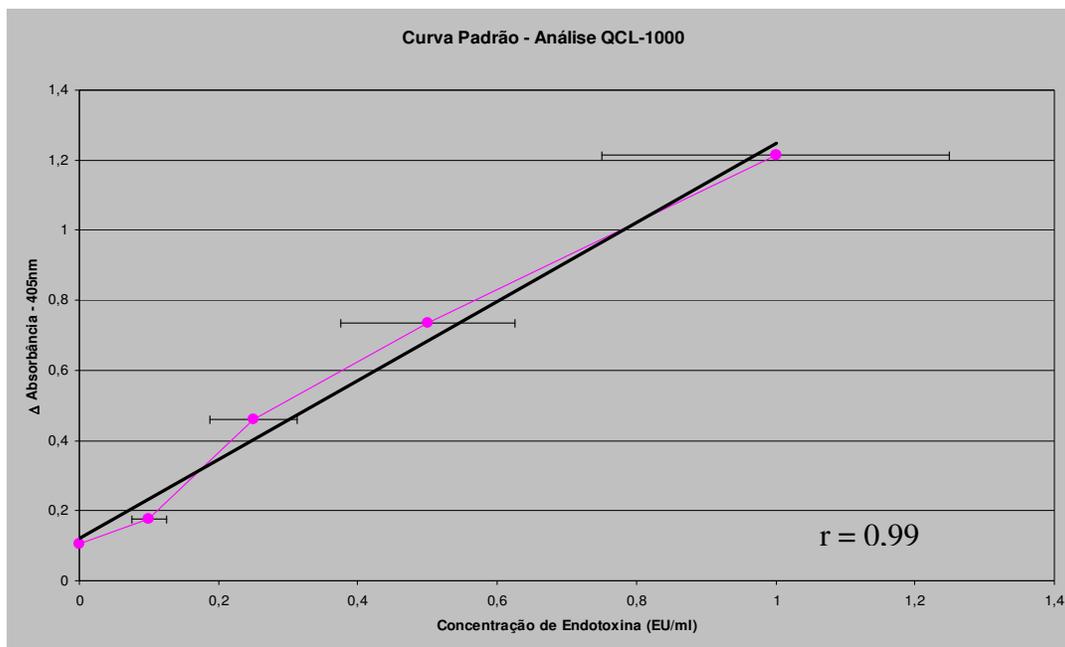


Figura 4. Curva padrão.

PADRONIZAÇÃO DAS DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS

O teste LAL pode ser influenciado por muitos fatores. Fatores da inibição devem ser evitados, para isso foi realizada a adição de uma quantidade conhecida de endotoxina (0,4 EU/ml), este procedimento é denominado “Spike”. A concentração conhecida foi adicionada a diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 de 4 amostras (2 iniciais e 2 após instrumentações). Os testes foram realizados como descrito a seguir (Tabela 3). Os resultados da concentração das amostras diluídas poderiam variar 25% para mais ou para menos. A diluição 1:100 foi aquela que apresentou maiores números de amostras dentro desse padrão, então foi a selecionada a realização dos testes de todas as amostras.

Tabela 3- Procedimentos para realização de testes cromogênico LAL (QCL – 1000).

	Amostras e curva padrão	“Blank” controle negativo
Amostra (diluição 1:100)	50 µl	-
Curva Padrão		
LAL água reagente	-	50 µl
LAL reconstituído	50 µl	50 µl
Agitação por 60 segundos e incubação por 10 minutos a 37 °C		
Solução de substrato reconstituído	100 µl	100 µl
Agitação por 60 segundos e incubação por 6 minutos a 37 °C		
“Stop Reagent” (ácido acético 25%)	100 µl	100 µl

Para quantificação das endotoxinas das amostras foram necessários: a) 8 poços contendo 50 µl da curva padrão (1, 0 EU/mL, 0,5 EU/mL, 0,25 EU/mL e 0,1 EU/mL em duplicata); b) 2 controles negativos e c) 50 µl das diluições (1:100) das amostras também em duplicata.

Diluições da curva padrão, controle negativo e das 24 amostras em duplicata foram dispostas na placa contendo 96 wells (Figura 3C) de acordo com o esquema abaixo (Figura 5).

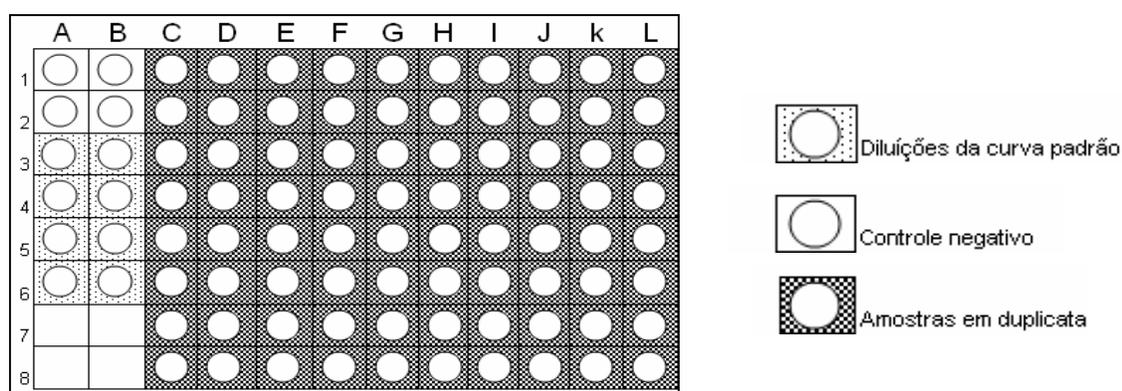


Figura 5. Disposição das amostras, curva padrão e controle negativo nas placas.

Cinquenta microlitros do LAL reconstituído foi adicionado em cada um dos poços já mencionados, agitados por 60 segundos e incubados por 10 minutos a 37°C. Depois, 100µl do “stop reagente” foram adicionados e as amostras agitadas. A leitura da placa foi realizada no leitor de ELISA (UILTRAMARK, Califórnia, EUA), a 405 nm através do software microtemplate imaging system (versão 5.0.1, Copyright 1999, Alfred Hercules Nobel Drive, CA) (Figura 3D).

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA

Dentro das condições da curva padrão, absorvância de 405 nm a concentração de endotoxina deve-se encontrar entre 0,1 a 1,0 EU/ml. Há vários métodos para determinar a concentração de endotoxina nas amostras. Para chegar a concentração inicial foi utilizado o método do cálculo de regressão linear da média de absorvância da curva padrão (as concentrações spike foram deduzidas).

Os cálculos foram realizados por planilha do excell (Microsoft Office Excel, versão 2003) fornecida pelo fabricante, onde:

r = eficiência da curva padrão

x= concentração da endotoxina

y= media dos valores da absorvância

N= números de curvas padrões utilizadas

X=somatórias da concentração de endotoxina da curva padrão em EU/ml

$\sum y$ = somatória dos valores da média de absorvância

$\sum xy$ = somatória concentração de endotoxina da curva padrão em EU/ml e somatória dos valores de absorvância

$$S_x = \text{Desvio padrão de } \sqrt{\frac{N\sum X^2}{N-(N-1)}}$$

$$S_y = \text{desvio padrão de } y = \sqrt{\frac{N\sum y^2 - (\sum y)^2}{N - (N-1)}}$$

$$\text{Slope} = \frac{S_y}{S_x} \cdot r$$

$$Y = \text{intercepto} = \sum/N - (\sum x/N \cdot \text{slope})$$

$$r = \frac{N\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N(N-1) S_x S_y}$$

$$\text{CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA} = \frac{\Delta \text{ absorbance} - y - \text{intercepto}}{\text{Slope}}$$

Para chegar à concentração final deve-se multiplicar pelo fator de diluição em que as amostras foram utilizadas (1:100 multiplicar por 100 a concentração obtida pelo cálculo matemático). O que é realizado automaticamente na planilha do excell.

4.4 Análise estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas SPSS for windows (SPSS Inc., Chicago, Illionis, USA) e Pacotico (Pacote estatístico, Bauru, São Paulo, Brasil):

- Para determinar o perfil dos casos estudados quanto aos aspectos microbiológicos, clínicos e radiográficos, assim como determinar a prevalência de diferentes gêneros e espécies isolados da saliva e dos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) através da análise de prevalência, utilizando o SPSS.

- Para testar hipótese nula de que não existe associação entre espécie isolada do canal radicular e a presença de sintomatologia clínica e, entre diferentes espécies isoladas numa mesma fase e nos diferentes momentos do tratamento através do(s) teste (s) “Chi-square de Pearson” e/ou “Fisher’s exact test” ($p=0,05$) quando apropriado; o qual foi complementado pelo teste de Odds ratio (OD), considerando associação positiva maior que 2 e negativa menor que 0,5, quando compreendido entre o intervalo de confiança de 95% (IC), utilizando SPSS.

- Para avaliar mudança na prevalência de uma mesma espécie isolada antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) aplicou-se o teste de MacNemar com nível de significância de 5%.

- Para comparar a concentração de endotoxinas encontradas em dentes sintomáticos e assintomáticos, aplicou-se o teste de Mann Whitney com nível de significância 5%, utilizando Pacotico.

- Para correlacionar a concentração de endotoxinas presente nos canais radiculares com a presença de sintomas específicos (dor à percussão ou dor à palpação) aplicou-se o teste de Spearman com nível de significância de 1%, utilizando SPSS.

- Para avaliar o efeito do preparo químico-mecânico na redução da concentração de endotoxina, utilizou-se o teste de Friedman ($p=0,05$); quando significativo, foi complementado pelo teste de Wilcoxon ($p=0,05$), utilizando Pacote.

5 RESULTADOS

5.1. Microbiota na infecção endodôntica primária e na saliva

5.1.1 Análise clínica e radiográfica

Os 30 dentes analisados pertenciam aos seguintes grupos dentários: 11/21 (n=7), 12/22 (n=8), 25 (n=3), 31/41 (n=6), 34/44 (n=4) e 35/45 (n=5) (Tabela 4). Todos os elementos dentários analisados apresentaram um único canal radicular. Dezenove dos 30 dentes analisados apresentavam restauração (63,33%), destas 18 eram definitivas e apenas 1 provisória. Quinze restaurações definitivas apresentavam características clínicas satisfatórias (ausência de sinais de infiltração e de lesão cariosa) e 3 comprometidas clinicamente (insatisfatórias). Cinco dentes restantes com presença de lesão cariosa e 6 dentes hígidos. Dezenove dos 30 casos analisados microbiologicamente (63,33%) apresentavam sintomatologia clínica (dor à percussão e/ou dor à palpação) no momento da coleta e 11/30 assintomáticos (36,67%). Um total de 07 dentes foram positivos para dor à percussão e 8 dentes positivos para dor à palpação, dentre eles, 4 dentes apresentaram dor à percussão e palpção (Tabela 4). Nenhum dos dentes avaliados apresentou dor espontânea. Exsudato estava presente em 5 canais radiculares, sendo 1 do tipo hemorrágico, 1 do tipo claro e 3 do tipo purulento. Dois dentes apresentaram mobilidade; odor estava presente em 6 canais radiculares; 10 casos avaliados apresentaram fístula intra-oral (Tabela 4). Tamanho das lesões periapicais variaram ente 1- 4 mm (n=2), 5- 9 mm (n=13) e 15 lesões foram maiores que 10 mm- (Tabela 4). Todos os dentes apresentaram sondagem peridontal entre 2 e 3 mm (n=30).

Características clínicas e radiográficas individuais de cada elemento dentário analisado podem ser observadas no apêndice 2.

Tabela 4. Características clínicas e radiográficas dos 30 dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

Dente		
Unirradicular	30	100
Superior	18	60
Inferior	12	40
Hígido	6	20
*Cariado	5	16,67
Restaurado	19	63,33
Restauração definitiva	18	94,73
Restauração provisória	1	5,27
Restauração definitiva satisfatória	15	83,33
Restauração definitiva insatisfatória	3	16,67
Sintomatologia		
Presente	11	36,67
Ausente	19	63,33
Tipo de Sintomatologia		
Dor à percussão	7	23,33
Dor à palpação	8	26,66
Dor à palpação e percussão	4	13,33
Histórico de dor prévia	9	30
Exsudato		
Ausente	25	83,33
Presente	5	16,67
Hemorrágico	1	20
Claro	1	20
Purulento	3	60
Mobilidade		
Presente	2	6,66
Ausente	28	93,34
Odor		
Presente	6	20
Ausente	24	80
Fístula		
Presente	10	33,33
Ausente	20	66,67
Sondagem periodontal		
≤ 3mm	30	100
Tamanho da lesão radiográfica		
1-4 mm	2	6,67
5-9 mm	13	43,33
10 mm	15	50

Cariado = Dentes cariados sem restauração; *Restauração definitiva satisfatória = ausência de lesão cariada e/ou sinal de infiltração; Restauração definitiva insatisfatória = presença de lesão cariada e/ou sinal de infiltração; Unirradicular = incluindo os elementos dentários de número 25.

5.1.2. Composição da microbiota da infecção endodôntica primária

A infecção endodôntica dos 30 dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical caracterizou-se por uma infecção do tipo mista com predomínio de microrganismos Gram-positivos (59,35%) e anaeróbios estritos (65,38%) (Tabela 5) (Figura 6). Entre os microrganismos anaeróbios estritos identificados, houve um predomínio em 28,3% de bacilos Gram-negativos e 21,42% de bacilos Gram-positivos (Figura 7).

Foram isolados cocos Gram-positivos (36,25%), bacilos Gram-negativos (33,53%), bacilos Gram-positivos (23,07%) e cocos Gram-negativos (7,15%) (Tabela 5).

Um total de 182 microrganismos foi encontrado, compreendendo 53 espécies bacterianas pertencentes a 20 diferentes gêneros e 1 espécie fúngica. A frequência do número de espécies por canal radicular variou de 4 a 11 (Figura 8), em média 6,74 espécies por canal radicular (Tabela 6).

Os microrganismos mais frequentemente identificados dos canais radiculares pertenceram aos gêneros *Peptostreptococcus* spp. 73,3% (n=22), *Prevotella* spp. 66,6% (n=20), *Streptococcus* spp. 60% (n=18), *Actinomyces* spp. 36,6% (n=11), *Clostridium* spp. 36,6% (n=11) e *Gemella* spp. 36,6% (n=11) (Figura 9).

Dentre as espécies isoladas, as mais frequentemente identificadas foram: *Peptostreptococcus micros* (n=19), *Prevotella intermedia* (n=15), *Streptococcus mitis* (n=9), *Capnocytophaga* spp. (n=9) e *Peptostreptococcus prevotii* (n=7) (Tabela 7).

Associações positivas foram encontradas entre os microrganismos *P. gingivalis* e *P. buccae* (p=0,014; OD=2,000; IC=0,751 a 5,239), *G. haemolysans* e *E. lentum* (p=0,001; OD=3,000; IC= 0,968 a 9,302), *B. ureolyticus* e *F. nucleatum* (p=0,039; OD=25,000; IC=1,521 a 410,865), *F. nucleatum* e *C. bif fermentans* (p=0,039; OD=25,000; IC=1,521 a 410,865), *S. mutans* e *S. salivarius* (p=0,007; OD=3,000; IC=0,606 a 14,864), *P. prevotii* e *E. limosum* (p=0,031; OD=16,500; IC 1,353 a 201,290), *G. haemolysans* e *Eubacterium* spp. (p=0,009; OD=19,000; IC=1,79 a 261,681), *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp. (p=0,004; OD=21,600; IC=2,086 a 223,651).

Associações negativas também foram observadas entre *Propionibacterium* spp. e *Fusobacterium* spp. ($p=0,048$; $OD=0,179$; $IC=0,081$ a $0,395$), *P. buccae* e *A. naeslundii* ($p=0,023$; $OD=0,107$; $IC=0,037$ a $0,312$).

Tabela 5. Distribuição bacteriana das coletas realizadas antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares avaliados.

	Antes da instrumentação (C1)	Após instrumentação (C2)
Número total de casos	30 (100%)	30 (100%)
Casos positivos	27 (90%)	13 (44,44%)
Casos negativos	3 (10%)	17 (56,66%)
Espécies diferentes por casos positivos	Média: 6.74 (\pm 1.58) Mediana: 7 (Range: 4-11)	Média: 0.9333 (\pm 1,22) Mediana: 0 (Range: 1-4)
Número total de microrganismos	182 (100%)	28 (100%)
Cocos Gram-positivos	66 (36,27%)	10 (35,71%)
Bacilos Gram-positivos	42 (23,07%)	10 (35,71%)
Cocos Gram-negativos	13 (7,15%)	2 (7,15%)
Bacilos Gram-negativos	61 (33,51%)	6 (21,43%)
Número de Gram-positivos	108(59,35%)	20 (71,43%)
Número de Gram-negativos	74 (40,65%)	8 (28,57%)
Número de facultativos	63 (34,62%)	19 (67,85%)
Número de anaeróbios estritos	119 (65,38%)	9 (32,5%)

Para o cálculo da média, mediana, desvio padrão e do range foram considerados apenas os casos cultura positiva na coleta antes do preparo químico-mecânico (C1). Para o cálculo do percentual de casos positivos e negativos após a instrumentação foi considerado o número total de casos com crescimento microbiano.

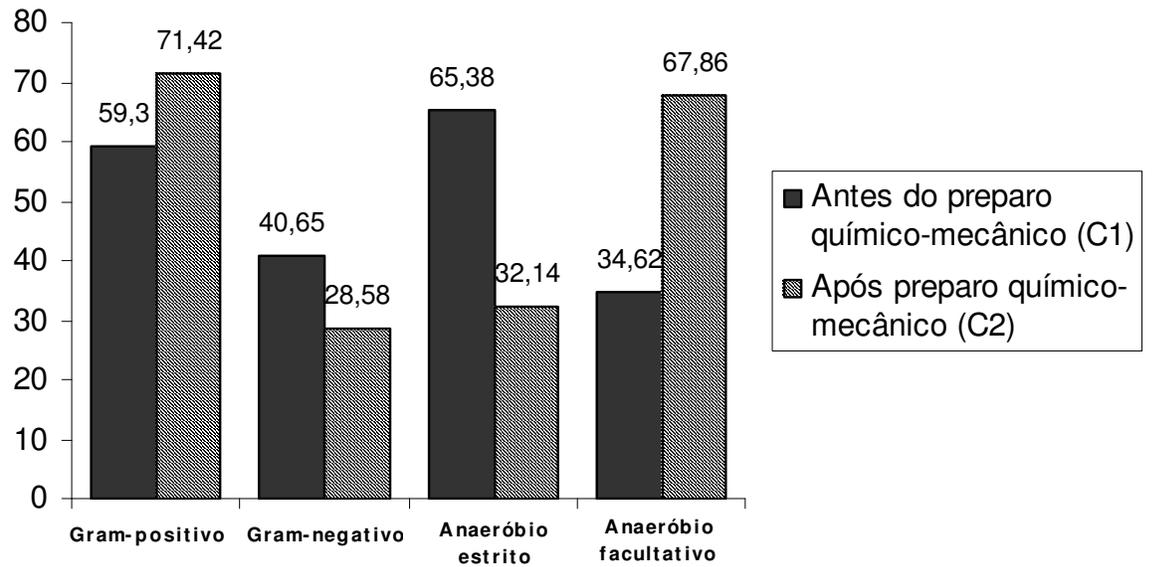


Figura 6. Frequência em valores percentuais dos microrganismos isolados antes (C1: 182 microrganismos) e após o preparo químico-mecânico (C2: 28 microrganismos) de acordo com coloração de Gram e requerimento gasoso.

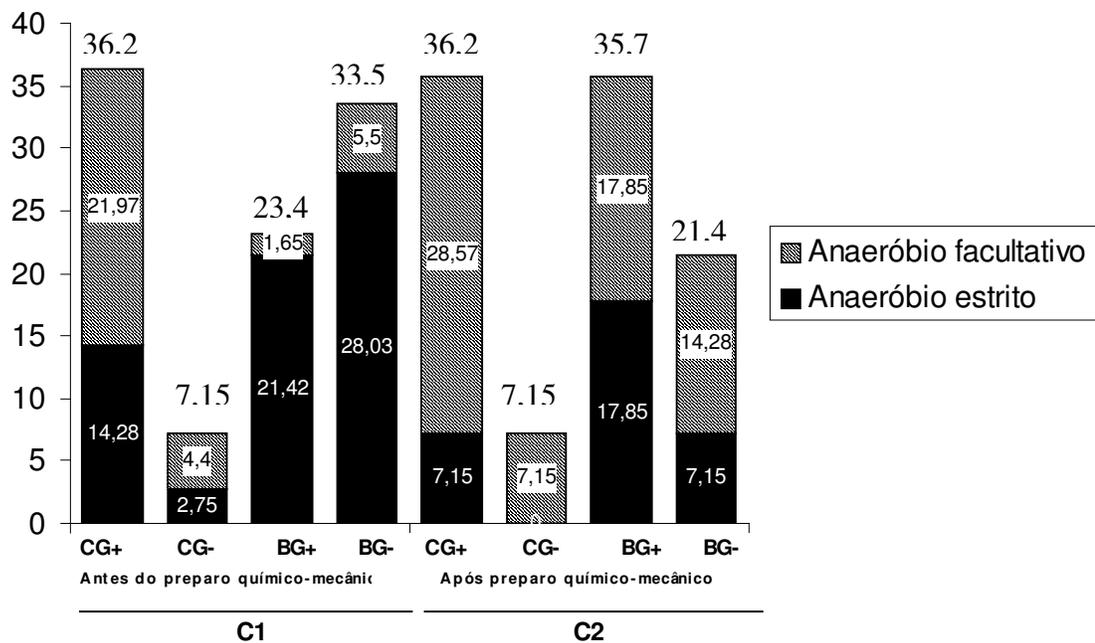


Figura 7. Perfil da microbiota em % quanto à coloração de Gram e requerimento gasoso antes (C1: 182 microrganismos) e após o preparo químico-mecânico (C2: 28 microrganismos).

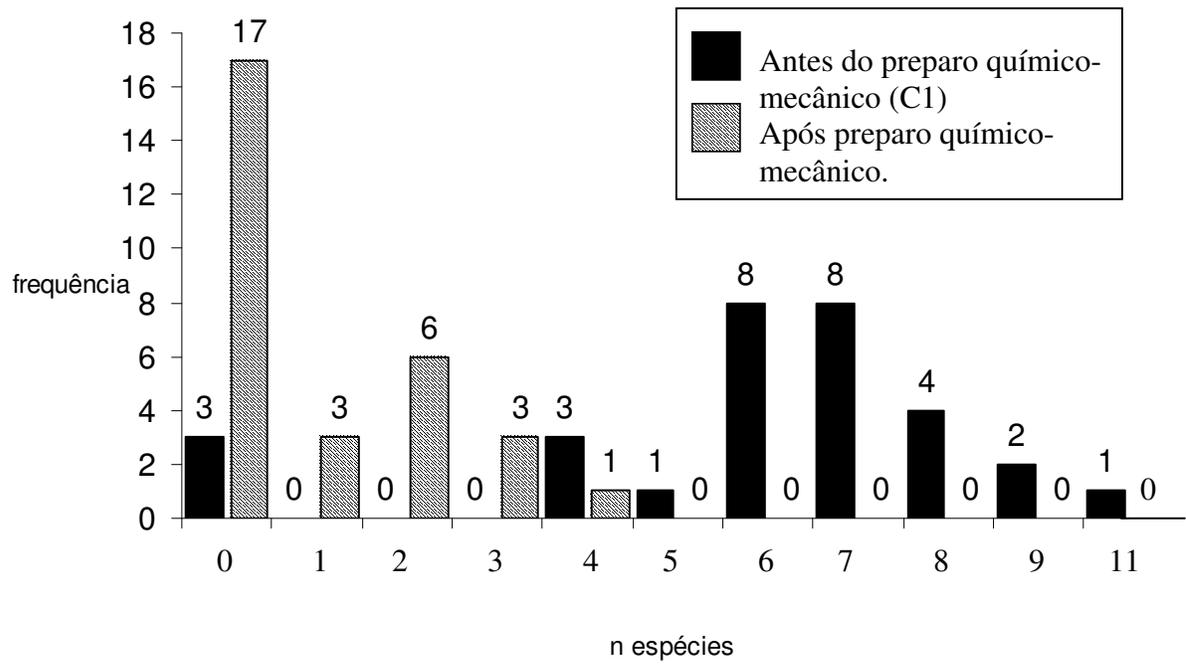


Figura 8. Frequência do número de espécies isoladas nos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2).

Tabela 6. Número de espécies microbianas isoladas dos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2).

Amostra	Antes do preparo químico-mecânico (C1)	Após preparo químico-mecânico (C2)
1	6	2
2	4	0
3	9	0
4	7	1
5	8	4
6	6	0
7	7	2
8	7	3
9	6	3
10	7	2
11	6	0
12	7	0
13	7	0
14	7	1
15	8	1
16	5	3
17	9	2
18	11	2
19	8	0
20	6	0
21	8	2
22	4	0
23	6	0
24	7	0
25	4	0
26	6	0
27	6	0
28	0	0
29	0	0
30	0	0
Média	6,74	0,933
Mediana	7	0
Desvio padrão	±0,89	±1,22
Soma	182	28

* Para o cálculo da média/mediana e do desvio padrão antes do preparo químico-mecânico (C1) foram considerados apenas os casos que houve crescimento bacteriano.

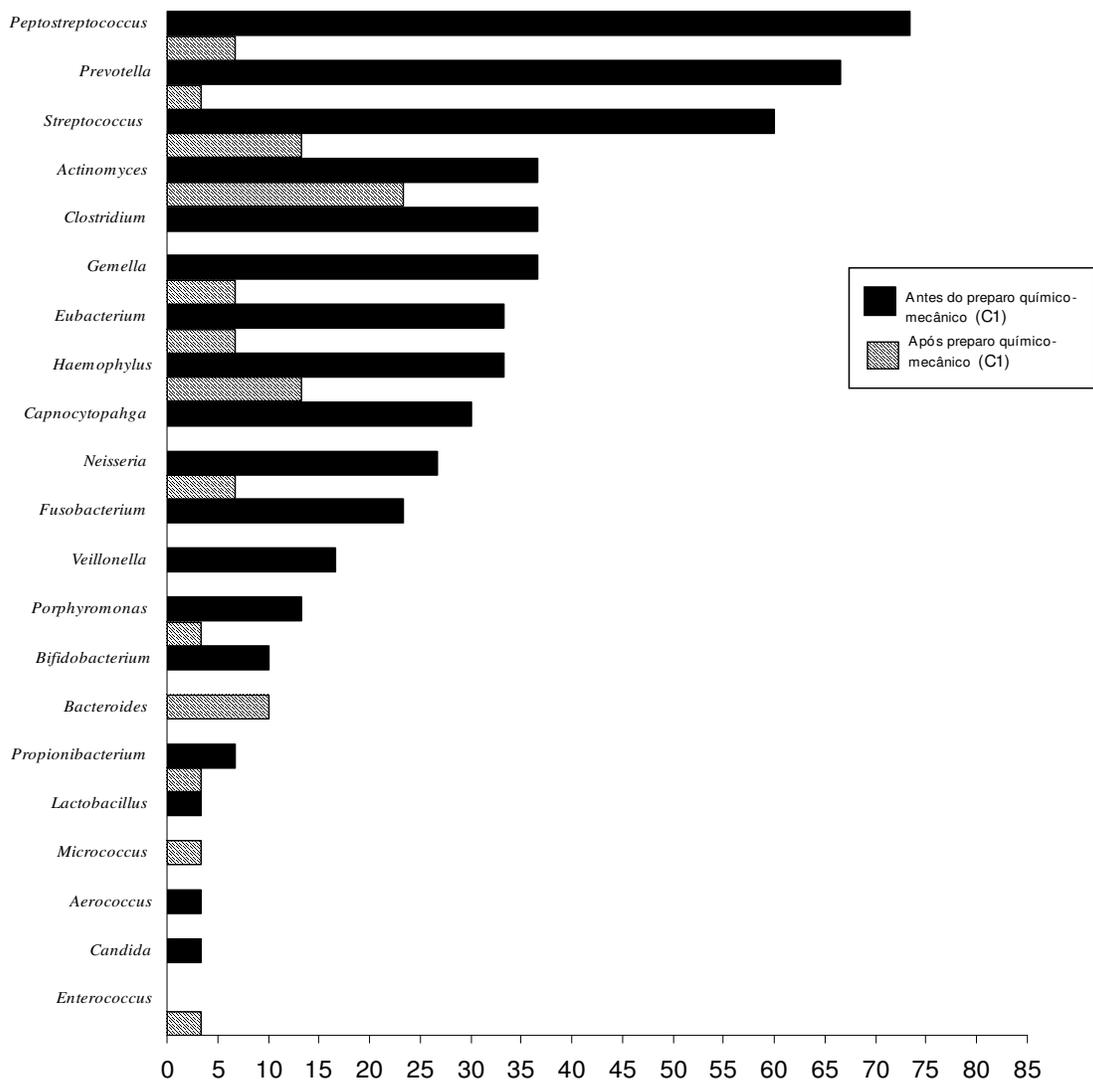


Figura 9. Frequência em valor percentual dos gêneros bacterianos isolados de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

Tabela 7. Distribuição dos microrganismos isolados antes (C1) e após (C2) o preparo químico-mecânico dos canais radiculares de acordo com as características morfológicas.

Microrganismos	Antes do preparo químico-mecânico (C1)	Após o preparo químico-mecânico (C2)
Cocos Gram-positivos	n	n
<i>Aerococcus</i> spp.	1	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	1
<i>Gemella haemolysans</i>	6	1
<i>Gemella morbilorum</i>	6	1
<i>Micrococcus</i> spp.	1	-
<i>Peptostreptococcus micros</i>	19	2
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	7	-
<i>Streptococcus constelattus</i>	2	-
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	-
<i>Streptococcus mitis</i>	9	3
<i>Streptococcus mitis 1</i>	2	-
<i>Streptococcus mutans</i>	3	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	1
<i>Streptococcus saliv. salivarius</i>	2	-
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	-
<i>Streptococcus oralis</i>	3	-
Bacilos Gram-positivos	n	n
<i>Actinomyces israelii</i>	1	1
<i>Actinomyces meyeri</i>	-	1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	5	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2	1
<i>Actinomyces viscosus</i>	5	3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	3	-
<i>Clostridium acetobutyricum</i>	5	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	3	-
<i>Clostridium clostridiforme</i>	2	-
<i>Clostridium</i> spp.	2	-
<i>Eubacterium limosum</i>	4	-
<i>Eubacterium lentum</i>	4	1
<i>Eubacterium</i> spp.	3	1
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	-
<i>Propionibacterium granulosum</i>	1	-
<i>Propionibacterium</i> spp.	1	1

Tabela 7. Distribuição dos microrganismos isolados antes (C1) e após (C2) o preparo químico-mecânico dos canais radiculares de acordo com as características morfológicas. (continuação).

Microrganismos	Antes do preparo químico-mecânico (C1)	Após o preparo químico-mecânico (C2)
Bacilos Gram-negativos	n	n
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	3	-
<i>Capnocytophaga</i> spp.	9	-
<i>Fusobacterium mortipherum</i>	1	-
<i>Fusobacterium varium</i>	2	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4	-
<i>Fusobacterium</i> spp.	1	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	-
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5	1
<i>Haemophilus</i> spp.	5	3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1	-
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4	1
<i>Prevotella</i> spp.	1	-
<i>Prevotella buccae</i>	2	1
<i>Prevotella intermedia</i>	15	-
<i>Prevotella loescheii</i>	1	-
<i>Prevotella oralis</i>	3	-
<i>Prevotella nigrescens</i>	1	-
Cocos Gram-negativos	n	n
<i>Neisseria</i> spp.	7	2
<i>Neisseria subflava</i>	1	-
<i>Veillonella</i> spp.	5	-
Fungo	n	n
<i>Candida albicans</i>	1	-

5.1.3. Aspectos clínicos x presença de microrganismos

Microrganismos estavam presentes em 100% dos dentes sintomáticos (11/11) e em 84,21% dos dentes assintomáticos (16/19) (Tabela 8).

A microbiota dos dentes sintomáticos apresentou as seguintes características: anaeróbios estritos foram identificados em 61,5%, predominando os microrganismos Gram-negativos (60,27%). Bacilos produtores de pigmentos negros foram identificados em 54,5% (6/11) (Tabela 8). Houve uma média de 4,09 espécies anaeróbias estritas por canal (variando entre 2 e 7 espécies por canal radicular). A média do número de espécies facultativas isoladas por canal radicular foi 2,45 (variando entre 1 e 5) (Tabela 8).

Por outro lado, anaeróbios estritos foram encontrados em 67,88% dos dentes assintomáticos (Tabela 8). Microrganismos gram-negativos estavam presentes em 58,72% dos canais. A média de espécies anaeróbias foi de 3,89 (variando entre 0 e 7) (Tabela 8); e a de espécies facultativas isoladas foi 1,8 (variando entre 0 e 4) (Tabela 8).

Associação positiva foi encontrada entre dor à percussão e *E. lentum* ($p=0,031$; OD=16,500; IC= 1,253 a 201,290); dor à palpação e *G. haemolysans* ($p=0,029$; OD=10,000; IC= 1,342 a 74,511) e *E. lentum* ($p=0,048$; OD=12,600; IC=1,072 a 148,128); fístula e *P. micros* ($p=0,037$; OD=8,800; IC=0,929 a 83,353); exsudato purulento e *Bifidobacterium* spp. ($p=0,020$; OD=52,000; IC=2,290 a 1180,822).

Tabela 8. Perfil da microbiota isolada na infecção endodôntica primária com presença de lesão periapical crônica em dentes sintomáticos e assintomáticos.

	Sintomáticos	Assintomáticos
N. total de casos	11	19
Casos positivos	11	16 (84,21%)
Casos negativos	0	3 (15,79%)
Espécies anaeróbias estritas	Media: 4,09 (Intervalo de variação: 2-7)	Média: 3,89 (Intervalo de variação: 0-7)
Espécies anaeróbias facultativas	Média: 2,45 (Range: 1 a 5)	Média: 1,8 (Range 0 a 4)
Número de Gram-negativos	44 (60,27)	64 (58,72%)
Número de Gram-positivo	29 (39,73%)	45 (41,28%)
Cocos Gram-positivos	28 (38,36%)	38 (34,85)
Cocos Gram-negativos	4 (5,48%)	9 (8,25%)
Bacilos Gram-positivos	16 (21,91%)	26 (23,85%)
Bacilos Gram-negativos anaeróbios	11/11 (100%)	15/19 (78,94)
BBPN (Frequência)	6/11 (54,54%)	12/19 (63,2%)
Total espécies	73	109

* Para o cálculo da média de espécies anaeróbias estritas e facultativas foram considerados os casos positivos e negativos.

5.1.4. Microbiota após o preparo químico-mecânico

Dos 27 canais radiculares com crescimento microbiano antes do preparo químico-mecânico, apenas 14 apresentaram cultura positiva após a intervenção endodôntica (48,15%) (Apêndice 4).

O perfil da microbiota após o preparo químico-mecânico caracterizou-se pelo predomínio de microrganismos Gram-positivos (71,43%) e anaeróbios facultativos (67,85%) (Figura 6). Cocos e bacilos Gram-positivos foram os mais frequentemente isolados em 35,71% (Figura 7).

Dos gêneros isolados, os mais freqüentes após a terapia endodôntica foram *Actinomyces* spp. 23,3% (n=7) *Streptococcus* spp. 13,3% (n=4) e *Haemophilus* spp. 13,3% (n=4) (Figura 9). O número de espécies isoladas dos canais radiculares variou entre 0 e 4 (Tabela 5).

A. viscosus (n=3), *Haemophilus* spp. (n=3) e *S. mitis* (n=3) foram as espécies mais freqüentemente identificadas (Tabela 7). *E. faecalis* foi identificado em apenas 1/13 canais radiculares com cultura positiva.

Mudanças na microbiota dos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) foram investigadas através do teste de MacNemar (p=0,05). *Prevotella* spp. (p=0,000), *Peptostreptococcus* spp. (p=0,000), *Gemella* spp. (p=0,0012), *Streptococcus* spp. (p=0,000), *Eubacterium* spp. (p=0,008), *P. micros* (p=0,000) e *G. haemolysans* (p=0,063) mostraram variações estatisticamente significantes, sendo pouco isolados após o tratamento.

5.1.5. Microbiota da saliva

Enterococcus faecalis foi identificado em 23,33% (7/30) das amostras coletadas da saliva (Tabela 9). Enterobactérias foram isoladas de 3 casos. *C. albicans*, esteve presente em 43,33% (13/30) das amostras da saliva de pacientes saudáveis (Tabela 9).

A presença concomitante de *Enterococcus faecalis* na saliva e no canal (após o preparo químico-mecânico) ocorreu em 1 caso (Tabela 10). *Candida albicans* foi encontrada em 43,33% (13/30), sendo detectada 1 vez apenas na saliva e no canal radicular (antes do preparo químico-mecânico) do mesmo paciente (Tabela 10). Enterobacterias só estiveram presentes na saliva, não sendo encontradas no canal radicular.

Tabela 9. Frequência de microrganismos isolados na saliva dos 30 pacientes com infecção endodôntica.

Microrganismos	n	Frequência (%)
Enterococos		
<i>E. faecalis</i>	7	23.33
<i>E. faecium</i>	1	3.33
<i>Enterococcus</i> spp.	2	6.66
Enterobacteria		
<i>Enterobacteria</i> spp.	1	3.33
<i>E. cloacae</i>	2	6.66
Fungo		
<i>C. albicans</i>	13	43.33

Tabela 10. Distribuição da presença de *E. faecalis* e *C. albicans* na saliva e no canal radicular.

Amostra	<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
	Canal radicular	Saliva	Canal radicular	Saliva
1	A	A	A	P
2	A	A	A	P
3	A	A	A	P
4	A	A	A	P
5	P	P	A	P
6	A	P	A	P
7	A	P	A	P
8	A	A	A	P
9	A	A	A	P
10	A	A	A	P
11	A	A	P	P
12	A	A	A	P
13	A	P	A	P
14	A	P	A	A
15	A	P	A	A
16	A	P	A	A

* A- ausente, P- presente

5.2. Efeito dos agentes antimicrobianos sistêmicos sobre microrganismos

Os resultados qualitativos foram definidos através das concentrações inibitórias conhecidas como “breakpoint”. Quando os valores medidos no E-test foram inferiores aos do breakpoint, as cepas foram consideradas suscetíveis (S). Por outro lado, as cepas que apresentaram valores iguais ou superiores do breakpoint foram consideradas cepas resistentes (R). A interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foram realizados de acordo com os breakpoints determinados pelo *Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI/NCCLS- 2007)*. Os breakpoints para eritromicina e azitromicina ainda não foram estabelecidos pelo *NCCLS*; sendo assim, padrões de suscetibilidade e resistência foram determinados de acordo com *van Winkelhoff et al. (2005)* (Tabela 11). Breakpoint para benzilpenicilina e cefaclor não foram atualizados no documento *NCCLS-2007*, sendo considerado o valor relatado em 1997. De acordo com *NCCLS-2007* o breakpoint da amoxicilina é equivalente ao da ampicilina, apesar, do breakpoint para amoxicilina não ter sido determinado. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ se referem às concentrações inibitórias mínimas efetivas contra 50% e 90% das cepas testadas.

Tabela 11. Valores interpretativos dos “breakpoints” (pontos de corte) para determinação da suscetibilidade/resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos testados de acordo com a metodologia estabelecida .

Agentes Antimicrobianos	Breakpoints	Metodologia
Amoxicilina (AC)	≤0,5 µg/mL	NCCLS 2007
Amoxicilina + Ácido clavulânico (XL)	≤2,0 µg/mL	NCCLS 2007
Benzilpenicilina (PG)	5 µg/mL	NCCLS 1997
Metronidazol (MZ)	≤8 µg/mL	NCCLS 2007
Cloranfenicol (CL)	≤8 µg/mL	NCCLS 2007
Clindamicina (CM)	≤2 µg/mL	NCCLS 2007
Azitromicina (AZ)	≤2 µg/mL	van Winkelhoff <i>et al.</i> (2005)
Eritromicina (EM)	4 µg/mL	van Winkelhoff <i>et al.</i> (2005)
Cefaclor (CF)	16 µg/mL	NCCLS 1997

Foram testadas as suscetibilidades antimicrobianas dos microrganismos *Prevotella intermedia* (n=10), *Prevotella buccae* (n=2), *Prevotella oralis* (n=3), *Prevotella loescheii* (n=1), *Porphyromonas gingivalis* (n=4), *Fusobacterium nucleatum* (n=4), *Fusobacterium varium* (n=2), *Fusobacterium necrophorum* (n=1), *Peptostreptococcus prevotii* (n=4), *Peptostreptococcus micros* (n=12) provenientes da coleta inicial (C1) aos antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, benzilpenicilina, clindamicina, cefaclor, eritromicina, metronidazol, cloranfenicol.

A tabela 12 mostra valores referentes aos intervalos de MIC, a concentração mínima inibitória de 50% (MIC50) e 90% (MIC90) em µg/mL das cepas analisadas e percentual de suscetibilidade das espécies testadas.

Amoxicilina, droga de primeira escolha na odontologia foi eficaz contra 87,5% de todas as cepas testadas. Cepas de *P. intermedia* (80%), *F. nucleatum* (75%) e *P. micros* (91,66%) foram suscetíveis a amoxicilina nos respectivos percentuais. Amoxicilina foi eficaz contra 100% das espécies de *P. prevotii*, *F. varium*, *P. buccae*, *P. oralis*, *P. gingivalis*, *P. loescheii*, *F. necrophorum* testadas.

A associação da amoxicilina ao ácido clavulânico e o Cefaclor (Cefalosporina de 2ª geração) foi eficaz contra todas as cepas das espécies microbianas testadas (Figura 10).

Clindamicina, atualmente, considerada droga de primeira escolha para pacientes alérgicos a penicilina, foi eficaz contra 81,25% das cepas testadas. *P. micros*, *P. prevotii*, *F. necrophorum*, *F. varium*, *P. oralis*, *P. buccae*, *P. loescheii* foram 100% suscetíveis a clindamicina. *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* foram suscetíveis em 50%, 70% e 75% respectivamente.

Benzilpenicilina foi eficaz contra 75% das cepas de *P. prevotii*, 91,66% de *P. micros*, 50% de *F. nucleatum* e 60% das cepas de *P. intermedia*..

Metronidazol foi eficaz contra 50% das cepas testadas da espécie *P. prevotii*, 66,66% *P. micros*, 70% *P. intermedia*, 75% *P. gingivalis* e 75% das cepas de *P. gingivalis*.

Cloranfenicol foi eficaz em 75% contra cepas pertencentes as espécies de *P. prevotii* e *F. nucleatum* e 91,66% contra cepas de *P. micros*.

As espécies *F. necrophorum*, *F. varium*, *P. oralis*, *P. buccae* e *P. loescheii* foram sensíveis a todos agentes antimicrobianos testados.

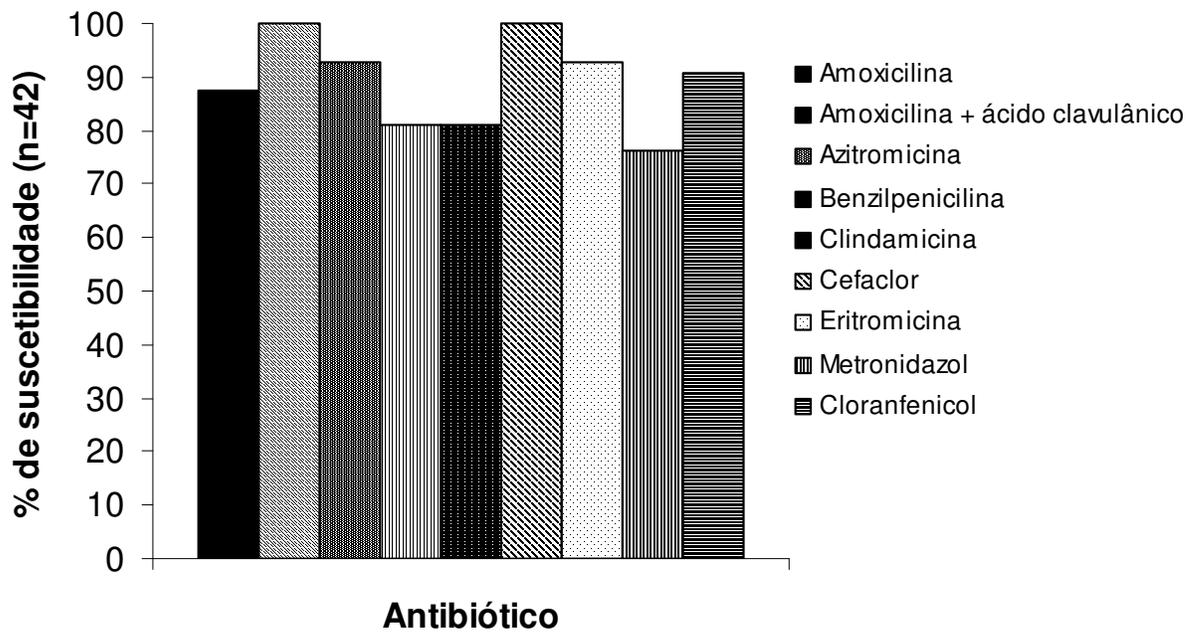


Figura 10. Percentual de suscetibilidade de espécies bacterianas isoladas de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, benzilpenicilina, clindamicina, cefaclor, eritromicina, metronidazol, cloranfenicol.

Tabela 12. Valores referentes aos intervalos de MIC, a concentração mínima inibitória de 50% (MIC50) e 90% (MIC90) em µg/mL das cepas analisadas e percentual de suscetibilidade das espécies testadas.

	Amoxicilina (0,5 µg/ml)	Amoxicilina + Clavulin (≤2 µg/ml)	Azitromicina (≤2 µg/ml)	Benzilpenicilina (0,5 µg/ml)	Clindamicina (≤2 µg/ml)	Cefaclor (16 µg/ml)	Eritromicina (4 µg/ml)	Metronidazol (≤8 µg/ml)	Cloranfenicol (≤8 µg/mL)
<i>Peptostreptococcus prevotti</i> (n=4)									
Range	0,016-0,38	0,094-0,125	0,50-1,0	0,016-0,50	0,016-0,50	0,032-1,5	0,016-16,0	0,75-192	0,047-12,0
MIC 50	0,016	0,19	0,75	0,016	0,016	0,064	0,5	0,125	0,75
MIC 90	0,047	0,19	0,75	0,25	0,38	0,75	0,75	8,0	1,5
Suscetibilidade (%)	100%	100%	100%	75%	100%	100%	75%	50%	75%
<i>Peptostreptococcus micros</i> (n=12)									
Range	0,023-2,0	0,19-2,0	0,25-1,5	0,016-48,0	0,016-1,0	0,023-1,5	0,016-0,125	0,023-0,032	0,016-12,0
MIC 50	0,023	0,19	0,75	0,19	0,094	0,19	0,38	0,75	6
MIC 90	0,25	0,125	1	0,125	0,75	1,5	0,75	12,0	0,75
Suscetibilidade (%)	91,66%	100%	100%	91,66%	100%	100%	100%	66,6%	91,66%
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n=4)									
Range	0,016-0,75	0,016-0,50	0,016-0,047	0,023-3,0	0,25-256	0,016-1,0	0,016-256	0,016-0,032	0,38-12,0
MIC 50	0,032	0,016	0,016	0,047	0,5	0,047	0,25	0,023	0,75
MIC 90	0,25	0,19	0,016	1	6,0	0,5	16,0	0,032	1,0
Suscetibilidade (%)	75%	100%	100%	50%	50%	100%	50%	100%	75%
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=1)									
Range	0,023	0,016	0,32	0,38	0,19	0,38	0,125	0,016	0,016
MIC 50	0,023	0,016	0,32	0,38	0,19	0,38	0,125	0,016	0,016
MIC 90	0,023	0,016	0,32	0,38	0,19	0,38	0,125	0,016	0,016
Suscetibilidade (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Fusobacterium varium</i> (n=2)									
Range	0,016-0,032	0,016-0,032	0,047-0,32	0,023-0,75	0,38-0,50	0,19-0,75	0,016-0,25	0,023-0,032	0,38-1,0
MIC 50	0,016	0,016	0,047	0,023	0,38	0,19	0,016	0,023	0,38
MIC 90	0,032	0,032	0,32	0,75	0,5	0,75	0,25	0,032	1,0
Suscetibilidade (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 12. Valores referentes aos intervalos de MIC, a concentração mínima inibitória de 50% (MIC50) e 90% (MIC90) em µg/mL das cepas analisadas e percentual de suscetibilidade das espécies testadas. (continuação).

	Amoxicilina (0,5 µg/ml)	Amoxicilina + Clavulin (≤2 µg/ml)	Azitromicina (≤2 µg/ml)	Benzilpenicilina (0,5 µg/ml)	Clindamicina (≤2 µg/ml)	Cefaclor (16 µg/ml)	Eritromicina (4 µg/ml)	Metronidazol (≤8 µg/ml)	Cloranfenicol (≤8 µg/mL)
<i>Prevotella intermedia</i> (n=10)									
Range	0,016-2,0	0,016-1,0	0,016-8,0	0,016-32,0	0,016-16,0	0,032-2,0	0,016-2,0	0,016-256	0,50-8,0
MIC 50	0,032	0,023	0,064	0,064	0,75	0,5	0,25	0,75	0,75
MIC 90	0,125	0,047	0,094	2	12	1,0	1,0	26,0	8,0
Suscetibilidade (%)	80%	100%	90%	60%	70%	100%	100%	70%	100%
<i>Prevotella oralis</i> (n=2)									
Range	0,016-0,19	0,064-0,125	0,047-0,25	0,016-0,047	0,016-0,032	0,016-0,125	0,047-0,75	0,016-0,032	0,38-1,0
MIC 50	0,016	0,064	0,047	0,016	0,016	0,016	0,047	0,016	0,38
MIC 90	0,19	0,125	0,25	0,047	0,032	0,125	0,75	0,032	1,0
Suscetibilidade (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Prevotella buccae</i> (n=2)									
Range	0,016-0,023	0,19	0,023-0,047	0,012-0,016	0,016-0,023	0,016	0,047-0,094	0,016-0,094	0,50-1,5
MIC 50	0,016	0,19	0,023	0,012	0,016	0,016	0,047	0,016	0,5
MIC 90	0,023	0,19	0,047	0,016	0,023	0,016	0,094	0,094	1,5
Suscetibilidade (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Prevotella loescheii</i> (n=1)									
Range	0,016	0,016	0,016	0,38	0,94	0,032	0,125	0,016	0,016
MIC 50	0,016	0,016	0,016	0,38	0,94	0,032	0,125	0,016	0,016
MIC 90	0,016	0,016	0,016	0,38	0,94	0,032	0,125	0,016	0,016
Suscetibilidade (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (n=4)									
Range	0,016-0,047	0,016-0,064	1,0-256	0,016-0,094	0,023-3,0	0,016-0,047	0,19-3,0	0,094-12,0	0,016-1,5
MIC 50	0,016	0,032	1,0	0,016	0,38	0,023	0,25	0,75	0,38
MIC 90	0,023	0,032	8,0	0,016	0,75	0,032	0,75	3,0	0,75
Suscetibilidade (%)	100%	100%	50%	100%	75%	100%	100%	75%	100%

5.3. Quantificação de endotoxinas nos canais radiculares infectados antes e após o preparo químico-mecânico

Endotoxina foi quantificada em 24/30 canais radiculares analisados microbiologicamente. Seis amostras foram perdidas durante as diversas fases do processamento laboratorial.

Na coleta inicial (C1), endotoxina foi detectada em 100% dos canais radiculares (n=24), cujos valores variaram de 17,00 a 696,00 EU/ml por canal radicular, representados pela mediana de 228,00 EUm/mL (Tabela 13).

Nos casos sintomáticos (n=11), a média da concentração de endotoxina antes da instrumentação foi de 500,36 EU/ml, valores compreendidos entre 272 e 696 Eu/ml por canal radicular. Já nos casos assintomáticos (n=13), a média da concentração de endotoxina foi equivalente a 127,53 EU/ml, variando entre 85,00 e 228,00 EU/ml por canal radicular (Tabela 14). A concentração de endotoxinas nos dentes sintomáticos foi significativamente maior ($p<0,01$) que nos dentes assintomáticos ($t=8651$; $p=0,008$; $df=21$) (teste t de amostras independentes).

Teste de spearman revelou associação positiva entre a presença de endotoxina e dor à percussão ($p<0,01$).

O preparo químico-mecânico com o auxílio da substância química hipoclorito de sódio 2,5% foi capaz de reduzir em média 59,9% da concentração inicial de endotoxina nos 24 canais radiculares avaliados (100%) (Tabela 13).

Diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a quantidade inicial de endotoxina e a quantidade residual nos canais radiculares após o preparo químico-mecânico (Teste não paramétrico de Friedman $p=0,000$ e Wilcoxon – $p= 0,000$ - nível de significância 5%).

Tabela 13. Quantificação de endotoxina (Eu/ml) antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos 24 canais radiculares.

Amostra	Coleta antes do preparo químico-mecânico (C1)	Coleta após preparo químico-mecânico (C2)	Percentual redução
1	388,00	381,00	1,80
2	139,00	3,00	97,85
3	53,00	48,00	9,44
4	635,00	25,00	96,07
5	145,00	31,00	78,63
6	149,00	8,00	94,64
7	272,00	110,00	59,55
8	417,00	86,00	79,37
9	228,00	67,00	70,62
10	157,00	109,00	30,58
11	270,00	145,00	53,70
12	696,00	224,00	67,81
13	558,00	252,00	54,84
14	196,00	78,00	60,20
15	85,00	5,00	94,12
16	121,00	26,00	78,52
17	17,00	11,00	35,30
18	37,00	16,00	56,75
19	519,00	236,00	54,53
20	682,00	46,00	93,25
21	103,00	58,00	43,68
22	228,00	117,00	51,32
23	459,00	301,00	34,43
24	608,00	347,00	42,93
Média	298,42	113,75	59,99
Mediana	228,00	72,50	58,15

Tabela 14. Concentração de endotoxinas (Eu/ml) nos casos sintomáticos (dor à percussão, DAP, e dor à palpação, DPP) e assintomáticos.

Casos	Sintomatologia		Eu/ml
	DAP	DPP	
Sintomáticos	Sim	Sim	635,00
	Sim	Sim	558,00
	Sim	Sim	696,00
	Sim	Não	519,00
	Sim	Não	388,00
	Sim	Sim	682,00
	Sim	Não	417,00
	Não	Sim	608,00
	Não	Sim	459,00
	Não	Sim	270,00
	Não	Sim	272,00
Média			500,36
Mediana			519
Assintomáticos	Não	Não	85,00
	Não	Não	149,00
	Não	Não	157,00
	Não	Não	139,00
	Não	Não	145,00
	Não	Não	53,00
	Não	Não	228,00
	Não	Não	228,00
	Não	Não	17,00
	Não	Não	37,00
	Não	Não	121,00
	Não	Não	103,00
	Não	Não	196,00
Média			127,53
Mediana			139
Média geral			298,42
Mediana geral			228

6 DISCUSSÃO

6.1. MICROBIOTA NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA E NA SALIVA

6.1.1. Composição da microbiota da infecção endodôntica primária

A desinfecção do campo operatório foi realizada de acordo com Gomes *et al.* (2004). As coletas da superfície externa da coroa e da face interna da cavidade de acesso resultaram em cultura negativa, confirmando a desinfecção do campo operatório. A esterilidade da substância química auxiliar (NaOCl) e do soro fisiológico estéril/apirogênico foram testadas para que não houvesse contaminação externa ao canal radicular. Todos os testes das soluções resultaram em culturas negativas indicando ausência de contaminação microbiológica.

Durante os procedimentos clínicos a assepsia foi controlada, uma vez que os resultados estão coerentes com microrganismos identificados de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

O hipoclorito de sódio 2.5% utilizado como substância química auxiliar no presente estudo foi manipulado pela Drogal (Farmácia de manipulação, Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brazil). A diluição do hipoclorito foi realizada com água estéril e sem conservantes, para que não houve interferência no estudo. Devido à instabilidade do NaOCl, o mesmo, foi manipulado em pequenas porções a cada 24 horas antes da intervenção endodôntica.

A técnica utilizada para realizar a coleta dos microrganismos neste estudo foi descrita previamente em detalhes por Gomes *et al.* (1994, 1996b e 2004). Nesses trabalhos ressaltou-se a importância da realização da coleta sob fluxo contínuo de nitrogênio (Berg & Nord, 1973) e transporte das amostras em meio VMGA III (Moller 1966, Dahlén *et al.*, 1993) a fim de preservar a viabilidade das espécies anaeróbias em função do seu potencial redox. Preconizou-se ainda processamento laboratorial no interior da cabine de anaerobiose,

assim como períodos longos de incubação (14 dias) para permitir o crescimento de espécies anaeróbias com metabolismo mais lento.

Meios de cultura ricos em nutrientes e seletivos foram utilizados para favorecer o crescimento do maior número possível de espécies microbianas.

Apesar das precauções tomadas para a realização da coleta e do processamento laboratorial, espécies muito sensíveis à presença de oxigênio podem não ter sobrevivido; uma vez que os meios empregados não permitem o crescimento de todos os microrganismos, principalmente os mais fastidiosos como espiroquetas e micoplasmas, assim como a espécie *Tannerella forsythia*, previamente conhecida como *Bacteroides forsythus*, espécie difícil de ser cultivada.

No entanto, com a introdução dos métodos moleculares, espécies de treponemas como *T. denticola* (Siqueira Jr *et al.*, 2001a; Rôças *et al.*, 2003; Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006a), *T. socranskii* (Siqueira Jr. & Rôças, 2003a; Baumgartner *et al.*, 2003), *T. forshytia* (Conrads *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2006a) passaram a figurar como possíveis patógenos endodônticos.

Apesar dos métodos moleculares permitirem a identificação de espécies microbianas ainda não cultiváveis (Munson *et al.*, 2002), aumentando o conhecimento da taxonomia, limitações em relação a estes métodos devem ser consideradas, particularmente nas infecções do tipo polimicrobiana, como foi observado no presente estudo em infecção endodôntica primária. Atenção especial deve estar voltada para a viabilidade das espécies envolvidas, uma vez que o sinergismo entre as mesmas aumenta o potencial de patogenicidade da flora infecciosa (Siqueira *et al.*, 1996, Drucker *et al.* (1997); assim como aos fatores de virulência e ao surgimento de resistência aos agentes antimicrobianos de uso freqüente no tratamento das infecções de origem endodônticas.

Dos 30 canais radiculares selecionados, 3 não apresentaram crescimento microbiano, e estavam clinicamente relacionados à casos assintomáticos e livres da presença de lesão cariada. A não detecção de microrganismos através do método de cultura, já foi observada anteriormente por Yoshida *et al.* (1987), Wasfy *et al.* (1992), Gomes *et al.* (1994) 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.

A infecção endodôntica mostrou-se polimicrobiana, sustentando trabalhos realizados por diferentes autores (Bergenholtz 1974; Sundqvist, 1976; Gomes *et al.*, 1994 e 1996a, Jacinto *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2007).

Cento e oitenta e dois microrganismos foram identificados antes do preparo químico-mecânico (C1), próximo ao valor relatado por Gomes *et al.* (2004) que identificaram 188 microrganismos em 41 canais radiculares com necrose pulpar dos 60 dentes analisados. Entretanto, Jacinto *et al.* (2003) ao analisarem microbiologicamente 48 canais radiculares (29 dentes apresentavam dor espontânea e 19 assintomáticos), identificaram 218 microrganismos. O número de canais radiculares analisados, o perfil dos casos selecionados, assim como a utilização de meios ricos e seletivos podem influenciar no número total de microrganismos identificados.

Houve um predomínio de bactérias anaeróbias e microaerófilas, representando 65,38% do número total de microrganismos identificados. O predomínio de microrganismos anaeróbios estritos em infecções endodônticas primárias concorda com os achados de Gomes *et al.* (1994) que encontraram 72,87% de anaeróbios estritos; Chu *et al.* (2005) 68,9%; Jacinto *et al.* (2003) 75%, Vianna (2006) 69.1%. A variação nos percentuais deve-se principalmente a seleção de casos e as diversas técnicas preconizadas por diferentes autores durante a coleta microbiológica e a fase de processamento laboratorial.

Foram identificadas 53 espécies bacterianas pertencentes a 20 diferentes gêneros nos 27 canais radiculares cultura positiva. Trabalhos realizados pelo método de cultura relataram a identificação de 55 espécies bacterianas pertencentes a 28 gêneros (Chu *et al.*, 2005); e 48 diferentes espécies microbianas pertencentes a 19 gêneros (Jacinto *et al.*, 2003).

Microrganismos Gram-positivos foram os mais predominantes, em 59,35%, concordando com os achados de Gomes *et al.* (1994; 2004), Jacinto *et al.* (2003) e Vianna (2006).

Cocos Gram-positivos (36,27%) e bacilos Gram-negativos (33,51%) foram mais freqüentemente isolados, diferindo dos achados de Peters *et al.* (2002), que relataram a predominância de bacilos Gram-negativos em mais de 40% e Gram-positivos próximo à

35% em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Chu *et al.* (2005) encontraram 45,1% de bacilos Gram-negativos e 26% de Cocos Gram-positivos em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical expostos ao meio bucal, e 44,3% de bacilos Gram-negativos e 29,2% de bacilos Gram-positivos em dentes sem exposição. Variação no perfil da microbiota parece estar relacionada com a seleção dos casos, ressaltando as condições clínicas dos dentes (expostos ou não na cavidade bucal); a presença ou ausência de sintomatologia; o grau de evolução da necrose pulpar; assim como às rotas utilizadas pelos microrganismos para atingirem a polpa. Uma vez que todos estes aspectos podem influenciar no perfil da microbiota.

As inter-relações entre os microrganismos sejam elas comensais ou antagonistas durante a evolução da infecção pulpar estão baseadas principalmente na demanda de nutrientes (Sundqvist *et al.*, 1992b; Gomes *et al.*, 1996a) podendo influenciar na prevalência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas.

Segundo Stefanopoulos & Kolokotronis (2004) bactérias anaeróbias estritas mais comumente isoladas nas infecções odontogênicas orofaciais ficam divididas principalmente em duas categorias de grupos distintos, cocos gram-positivos e bacilos Gram-negativos. No presente estudo, entre os microrganismos anaeróbios estritos e microaerófilos identificados, houve predomínio das espécies de bacilos Gram-negativos (28,03%), concordando com os achados de Peters *et al.* (2002) e Chu *et al.* (2005).

O número de espécies identificadas por canal radicular variou de 4 a 11 (média 6,4); valores que concordam com os achados de Peters *et al.* (2002), Chu *et al.* (2005) e Vianna *et al.* (2007) ao analisarem microbiologicamente dentes com infecção endodôntica primária.

Os microrganismos mais frequentemente identificados nos canais radiculares com necrose pulpar pertencem aos gêneros *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *Gemmella* spp. como demonstram os achados na literatura (Fabricius *et al.*, 1982a; Wasfy *et al.*, 1992; Gomes, 1995; Möller, 1996; Jung *et al.*, 2000; Lana *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2007). A alta prevalência dos gêneros citados, parece estar relacionada com suas inter-relações nutricionais (Loesche, 1998).

Peptostreptococcus micros, a espécie mais frequentemente identificada, esteve presente em 19/30 canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical analisados. A predominância de *P. micros* em canais radiculares infectados por necrose pulpar concorda com os achados de Gomes *et al.* (2004), ao identificarem a espécie em 41/60 dentes com analisados.

A ocorrência de *P. micros* em dentes com necrose pulpar apresentando diferentes condições clínicas tem sido relatada na literatura através do método de cultura: em dentes com e sem exposição pulpar a cavidade bucal (Chu *et al.*, 2005); com presença ou ausência de dor espontânea (Jacinto *et al.*, 2003) e em casos de abscesso perirradicular agudo (Gomes *et al.*, 1996a), assim como através de métodos moleculares (Riggio *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2003). Apesar do *P. micros* ser uma espécie microaerófila, não é muito sensível à presença de oxigênio, conseqüentemente não dificultando o seu cultivo e sua identificação (Tally *et al.*, 1975; Siqueira *et al.*, 2003).

Os bacilos produtores de pigmentos negros (BPPN: *P. intermedial nigrescens*, *P. corporis*, *P. gingivalis*, *P. loescheii*, *P. denticola* e *P. melaninogenica*) foram isolados em 19/30 dentes (63,33%) com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Dougherty *et al.* (1998) e Siqueira *et al.* (2001) relataram a frequência de BPPN em 67% e 59,3% respectivamente; em contraste com os achados de Sundqvist *et al.* (1989) e Baumgartner *et al.* (1999), os quais relataram a presença BPPN em apenas 30% dos casos de necrose pulpar.

A variação no percentual de identificação de BPPN pode estar relacionada com o crescimento lento das espécies, mesmo em meios ricos em nutrientes suplementados com hemina e menadiona (Grenier & Mayrand, 1986; Flynn, 2000), requerendo tempo de 7 dias ou mais de incubação até que a pigmentação seja notória no meio de cultura; além do fato das espécies serem muito sensíveis a presença de oxigênio (Carlsson *et al.*, 1977). Vale ainda ressaltar a sensibilidade de determinadas espécies, *P. asacharolyticus* e *P. gingivalis*, à vancomicina presente em meios seletivos (Winkelhoff & Graaff, 1983). Segundo Sundqvist *et al.* (1989) espécies de *P. gingivalis*, *P. denticola* e *P. loescheii* requerem sangue de coelho para demonstrar características de pigmentação.

Entre os bacilos produtores de pigmentos negros, *Prevotella intermedia* foi a espécie mais frequentemente identificada nos canais (15/30) seguida de *Porphyromonas*

gingivalis (4/30) e posteriormente *Prevotella loescheii* (1/30); cocordando com os achados nas infecções endodônticas primárias identificados por cultura (Lana *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, (2007) e detectados através de PCR (Gomes *et al.*, 2005b; Sakamoto *et al.*, 2006; Tomazinho & Ávila, 2007). Foi também a segunda espécie mais identificada entre as 53 espécies bacterianas presentes nos canais radiculares analisados infectados e com presença de lesão periapical.

Estudos realizados através de cultura demonstraram que *P. intermedia* é uma das espécies mais encontradas nos casos de necrose pulpar (Lana *et al.*, 2001) e nos casos de dentes assintomáticos com presença de lesão periapical crônica (Peters *et al.*, 2002). Tomazinho & Ávila-Campos (2007) ao analisarem 33 dentes com infecção endodôntica crônica através da cultura verificaram a presença dos BPPN nos respectivos percentuais: *P. intermedia*/*P. niegrascens* (75,6%), *P. gingivalis* (12,5%), *P. endodontalis* em (9,1%).

De acordo com os achados do presente estudo e em estudos realizados anteriormente (Lana *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2002; Tomazinho & Ávila-Campos, 2007) BPPN participam não só nas infecções endodônticas de dentes sintomáticos, como relatado por Sundqvist *et al.* (1992b) e Wade (2004), mas também nas infecções endodônticas crônicas, podendo até desempenhar papel na etiologia e na perpetuação das doenças perirradiculares.

Segundo Slots & Taubman (1992) bactérias proteolíticas constituem parte significativa da microbiota da porção apical do canal radicular, interagindo com tecidos periapicais. O contato com tecidos periapicais pode aumentar a tensão de oxigênio inibindo o seu crescimento. Entretanto, o pequeno número de espécies anaeróbias facultativas presentes no segmento apical provavelmente consome o oxigênio disponível, promovendo óxido-redução e favorecendo a colonização de espécies anaeróbias estritas. Evidência quanto esta informação torna-se notória no presente estudo, uma vez que os bacilos produtos de pigmentos negros (BPPN) só foram detectados nos canais radiculares analisados na presença de espécies anaeróbias facultativas.

A alta incidência de *P. intermedia* e *P. micros* concomitante nos canais radiculares, pode estar relacionada com o metabolismo dessas espécies. Segundo Ter Steeg & Van der Hoeven (1989) a espécie *P. micros* apresenta uma diversidade de peptidases na forma ativa,

as quais disponibilizam aminoácidos e peptídeos de glicoproteínas serosas. Aminoácidos e peptídeos disponibilizados pela espécie *P. micros* podem ser utilizados para o processo de fermentação das espécies produtoras de pigmentos negros, dentre elas a *P. intermedia* (Carlsson *et al.*, 1986), estabelecendo assim uma inter-relação sinérgica nutricional entre as espécies.

Dentro do grupo dos *Streptococcus*, a espécie *S. mitis* foi a mais freqüentemente identificada nos canais radiculares analisados. A alta prevalência *S. mitis* em infecções de origem endodôntica já foi relatada anteriormente por Sundqvist (1992b); assim como a alta prevalência do gênero *Streptococcus* nas infecções crônicas de origem endodôntica (Gomes *et al.*, 1996b) e nas doenças perirradiculares agudas (Lewis *et al.*, 1986; Siqueira *et al.*, 2002b), sugerindo a possível participação destas espécies nas infecções endodônticas como patógenos oportunistas.

Actinomyces spp. foi identificado em 9,43% dos canais, próximos dos valores relatados na literatura que variam entre 10 e 15% (Byström *et al.*, 1987; Sundqvist *et al.*, 1992b; Gomes *et al.*, 1996b).

A baixa prevalência do gênero *Propionibacterium* spp. nas amostras coletadas de canais radiculares com infecção endodôntica primária, já foi relatada anteriormente na literatura por Gomes *et al.*, (1996b), Lana *et al.*, (2001), Chu *et al.* (2005) em diferentes situações clínicas, concordando com os achados do presente estudo. Entretanto, Vianna (2006) relatou alta freqüência do gênero nas diferentes coletas realizadas em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Apesar de espécies pertencentes ao gênero *Propionibacterium* spp. serem habitantes normais da cavidade bucal, pouco se sabe em relação à patogenicidade das mesmas (Sjogren *et al.*, 1988).

Os gêneros *Propionibacterium* e *Actinomyces* têm sido associados a lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico (Sundqvist & Reuterving, 1980; Nair *et al.*, 1984; Sjögren *et al.*, 1988, 1997). Essas bactérias se apresentam menos suscetíveis aos procedimentos químico-mecânicos da terapia endodôntica (Gomes *et al.*, 1996b; Sjögren *et al.*, 1997). Uma vez instaladas no canal radicular, podem atingir os tecidos periapicais e lá sobreviverem, driblando o sistema imune e causando infecções que

só podem ser removidas cirurgicamente (Sundqvist & Reuterving, 1980; Nair *et al.*, 1984; Sjögren *et al.*, 1988, 1997).

Gemella spp., patógeno oportunista capaz de causar infecções severas locais e generalizadas foi freqüentemente identificada nos canais analisados. A sua alta prevalência em infecções primárias têm sido relatada na literatura através de cultura (Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2007) e métodos moleculares (Sassone *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007). As espécies *G. haemolysans* e *G. morbillorum* foram identificadas no em 36,66% no presente estudo; concordando com os achados de Sousa *et al.* (2007) e Gomes *et al.*, 2007 ao relatarem prevalência de 30% e 36% respectivamente. Apesar da alta prevalência encontrada nos canais radiculares, pouco se sabe sobre o papel destas espécies nas infecções endodônticas primárias.

Para determinar associações entre espécies, Sundqvist *et al.* (1992b); Lana *et al.*, (2001) e Peters *et al.* (2002) utilizaram teste de odds ratio verificando a presença de uma determinada espécie, na presença ou ausência de demais espécies bacterianas identificadas. O mesmo foi realizado no presente estudo, considerando associação positiva entre uma determinada espécie na presença de outra espécie, quando o odds ratio foi maior do que 2; enquanto duas espécies foram consideradas negativamente associadas, quando o odds ratio em detectar uma espécie na presença de outra fosse menor 0,5.

Associações estatisticamente significantes foram encontradas entre *Fusobacterium* spp. x *Clostridium* spp., *G. haemolysans* x *Eubacterium* spp., *P. prevotti* x *E. limosun*, *B. ureolyticus* x *F. nucleatum*. Associações negativas também foram observadas entre *Propionibacterium* spp. x *Fusobacterium* spp., *P. buccae* x *A. naeslundii*. Associações entre espécies bacterianas nas infecções endodônticas primárias já foram anteriormente reportadas por outros autores (Gomes *et al.*, 1994; Drucker *et al.*, 1997; Lana *et al.*, 2001).

Evidências experimentais indicam que o sinergismo entre espécies bacterianas isoladas nas infecções de origem endodônticas pode aumentar o potencial de patogenicidade da flora infecciosa (Sundqvist *et al.*, 1979; Takemoto *et al.*, 1997; Siqueira *et al.*, 1998).

6.1.2. Aspectos clínicos x presença de microrganismos

A microbiota dos canais radiculares em dentes clinicamente sintomáticos com presença de necrose pulpar e lesão periapical diferiu da encontrada nos dentes assintomáticos com necrose pulpar e presença de lesão periapical, concordando com os achados na literatura (Yoshida *et al.*, 1987; Jacinto *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2006).

Microrganismos foram identificados em 100% nos dentes sintomáticos analisados e em 84,21% dos assintomáticos. Espécies anaeróbias estiveram presentes em maior número nos dentes sintomáticos quando comparada às espécies facultativas, e aos dentes assintomáticos, concordando com os achados de Gomes *et al.* (1994) e Jacinto *et al.* (2003).

Siqueira *et al.* (2002b) relataram existir associação entre bacilos Gram-negativos anaeróbios e a presença de sinais e sintomas nas infecções de origem endodôntica. Evidência desta associação pode ser observada no presente estudo, no qual pelo menos 1 espécie de bacilo Gram-negativo foi identificada em 100% dos canais radiculares de dentes sintomáticos diferindo dos casos assintomáticos (15/19).

A relação das bactérias Gram-negativas com a presença de sintomatologia deve-se à presença do componente estrutural presente na parede celular, chamado LPS (lipopolissacarídeo). Este por sua vez, pode iniciar e/ou exacerbar a resposta inflamatória (Dahlén, 1980; Horiba *et al.*, 1992; Barthel *et al.*, 1997), contribuindo para o aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissores nas terminações nervosas das áreas de lesão, potencializando a sensação dolorosa (Seltzer *et al.* 1994), fazendo com que as reações periapicais sejam sintomáticas ou perpetuem; além de estarem relacionadas às reabsorções ósseas apicais (Sundqvist, 1994) em função da resposta do hospedeiro.

A média de espécies anaeróbias estritas identificadas por canal radicular foi de 4,09 em dentes sintomáticos e 3,89 em dentes assintomáticos com necrose pulpar e presença de lesão periapical; concordando com os achados de Sakamoto (2006), ao relatarem maior diversidade de espécies bacterianas identificadas em dentes sintomáticos quando comparado aos dentes assintomáticos através de PCR.

Estudos na literatura demonstram associações específicas de bactérias e a presença de sinais e sintomas (Gomes *et al.*, 1994; Drucker *et al.*, 1997; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004).

O teste de percussão pode determinar a presença de patologia nos tecidos periapicais. Resultado positivo indica a presença de inflamação no ligamento periodontal (Gomes *et al.*, 1994). No presente estudo, dor à percussão foi correlacionada à presença da espécie *E. lentum*. (p=0,031), concordando com os achados de Drucker *et al.* (1997) ao correlacionarem a ocorrência de *Eubacterium* spp. e a presença da sintomatologia clínica.

Dor à percussão, foi anteriormente correlacionada com a ocorrência de outras espécies bacterianas nos canais radiculares tais como: *Prevotella* spp. e *P. melaninogenica* (Drucker *et al.*, 1997); *Bifidobacterium* spp., *Actinomyces* spp. e *S. constellatus* (Jacinto *et al.*, 2003), *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp. (Gomes *et al.*, 2004).

Segundo Griffiee *et al.* (1980) dor à palpação é considerado um importante exame para definir o diagnóstico de abscesso periapical. Jacinto *et al.* (2003) correlacionaram a presença das espécies *P. gingivalis* e *P. micros* com a presença de dor à palpação. Dor à palpação no presente estudo foi associada à presença das espécies *G. haemolysans* (p=0,029) e *E. lentum* (p=0,048).

P. micros, a espécie mais prevalente entre os cocos Gram-positivos anaeróbios nas infecções odontogênicas (Murdoch *et al.*, 1994; Kuryiama *et al.*, 2002), e a espécie mais frequentemente isolada nos canais radiculares estudados, parece estar associado à presença de dor (Drucker *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2004), edema (Drucker *et al.*, 1997, Gomes *et al.*, 1994), dor à percussão (Gomes *et al.*, 1994), presença de exsudato (Gomes *et al.*, 1994), história de dor prévia (Gomes *et al.*, 2004), presença de radiolucidez periapical (Drucker *et al.*, 1997). O presente estudo sugere a presença desta espécie nos casos com presença de fistula, uma vez que este microrganismo na cavidade bucal está relacionado com a presença de abscessos periodontais e peirradiculares (Rams *et al.*, 1992; Murdoch, 1998).

G. haemolysans, a qual estava associada a presença de *E. lentum* nos canais radiculares do presente estudo, foi associada a presença de dor à palpação. Individualmente, a espécie *G. morbillorum* foi associada a presença de dor à percussão e dor à palpação na

infecção endodôntica primária através de nested PCR (Gomes *et al.*, 2007). Os achados sugerem que espécies pertencentes ao gênero *Gemella* spp. podem estar relacionadas com a presença de sintomatologia clínica nas infecções endodônticas.

A associação da espécie *E. lentum* à presença de dor à percussão e à palpação (Yoshida *et al.*, 1987 e Jung *et al.* 2000) pode estar relacionada à presença de componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas, tais como peptidoglicanos e ácidos lipoteicos, os quais estão diretamente relacionados com a destruição dos tecidos perirradiculares. Wade *et al.* (1994), relataram a participação do gênero *Eubacterium* spp. nos abscessos odontogênicos de origem endodôntica. Informações estas, que contribuem para possível relação da espécie com a presença de dor à percussão.

No presente estudo a presença de exsudato do tipo purulento foi associada à espécie *Bifidobacterium* spp. ($p=0,020$). *Bifidobacterium* spp. é uma das espécies acidogênicas que participam no processo da cárie dental, com capacidade de sobreviver em pH elevados (Beighton, 2005). Um papel importante da espécie está relacionado à proteção contra bactérias que participam no processo de putrefação (Bioviti *et al.*, 2000); dados que sugerem a possível participação da espécie nos processos de infecções com coleção do tipo purulenta.

Bacilos produtores de pigmentos negros (BPPN) vêm sendo associados à infecções endodônticas sintomáticas (Sundqvist, 1992b; van wilkenhoff *et al.*, 1985; Jacinto *et al.*, 2003). Mais recentemente métodos moleculares têm falhado em mostrar tal associação (Siqueira *et al.*, 2001; Fouad *et al.*, 2002). Apesar da alta prevalência de *P. intermedia*, espécie produtora de pigmentos negros, esta não apresentou associação com qualquer tipo de sintomatologia clínica, concordando com os achados de Haapasalo *et al.* (1986). A não associação entre as espécies produtoras de pigmentos negros e a presença de sintomatologia clínica, pode estar relacionada com o número de casos com sintomatologia clínica analisados.

6.1.3. Microbiota da saliva

A técnica de coleta da saliva utilizada no presente estudo, coleta da saliva total não estimulada, é considerada um dos métodos mais sensíveis para detecção de microrganismos presentes na saliva de indivíduos saudáveis (Oliver & Shilitoe 1984). Entretanto, este método não permite determinar a localização do microrganismos na cavidade bucal, como observado pela técnica de “imprint culture” (Arendorf & Walker, 1980).

Apesar de alguns autores demonstrarem que os métodos moleculares são mais eficazes na detecção de microrganismos, particularmente de *enterococcus* spp., em diferentes sítios orais (Sedgley *et al.*, 2005; Sedgley *et al.*, 2006) quando comparados a cultura; esta maior prevalência detectada por PCR parece estar superestimada, uma vez que pode detectar DNA de células mortas pertencentes a flora transitória.

Como parte do protocolo de coleta das amostras de saliva, foi solicitado que os pacientes se mantivessem em jejum por pelo menos até duas horas antes do procedimento de coleta da amostra. Isto deve-se ao fato de que os microrganismos, especialmente enterococci, freqüentemente isolado de comidas fermentáveis (Franz *et al.*, 2003), podem sobreviver na cavidade bucal por até 100 minutos (Razavi *et al.*, 2007) após ingestão, fazendo parte da microbiota transitória, interferindo diretamente nos resultados obtidos através de técnica de cultura.

Ao longo dos anos, diversos estudos têm relatado a ocorrência de patógenos persistentes em canais radiculares infectados (Haapasalo *et al.*, 1986; Waltimo *et al.*, 1997; Molander *et al.*, 1998; Sedgley *et al.*, 2006). Tal fato é de suma importância, uma vez que, estes microrganismos podem retardar o processo de cicatrização dos tecidos periapicais ou até mesmo contribuir para a perpetuação da lesão periapical (Haapasalo *et al.*, 1986; Waltimo *et al.*, 1997; Molander *et al.*, 1998). Entretanto, a via que estes microrganismos chegam ao canal radicular, e os colonizam, ainda é questionada (Haapasalo *et al.*, 1986; Siren *et al.*, 1997). Porém, a infiltração coronária parece ser uma das principais vias de contaminação, uma vez que estes microrganismos são comumente isolados de diferentes

sítios da cavidade bucal, particulamente, espécies de *Candida* (Odds, 1994; Egan *et al.*, 2002) e *Enterococcus* (Williams *et al.*, 1959; Engström, 1965; Sedgley *et al.*, 2005).

Apesar de vários estudos relatarem a ocorrência de patógenos persistentes em infecções endodônticas primárias (Gomes *et al.*, 1994; Waltimo *et al.*, 1997; Egan *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2005) e em diferentes sítios da cavidade bucal (Engström, 1965; Goldman & Pearson, 1969; Sedgley *et al.*, 2005; Sedgley *et al.*, 2006), poucos estudos (Egan *et al.*, 2003; Sedgley *et al.*, 2006) investigaram a ocorrência simultânea no canal radicular e na saliva de um mesmo paciente.

A ocorrência de *Enterococcus* spp. na cavidade bucal varia entre 4% a 68% dependendo da região coletada e da técnica utilizada para coleta (Williams *et al.*, 1950; Gold *et al.*, 1975; Engström, 1965; Sedgley *et al.*, 2006). A técnica de coleta da saliva utilizada no presente estudo (saliva total não estimulada), recentemente aplicada por Egan *et al.* (2002), foi descrita anteriormente como um dos métodos mais sensíveis para detecção de microrganismos presentes na saliva (Oliver & Shilitoe, 1984), exceto em não permitir o estudo da distribuição de microrganismos (Arendorf & Walker, 1980).

Recentemente, Sedgley *et al.* (2006) investigando a prevalência de *E. faecalis* em diferentes sítios da cavidade bucal, relataram valores equivalentes a 29% nas amostras de saliva e apenas 9% nos canais radiculares. Concordando com estes achados na literatura, *Enterococcus* spp. esteve presente em 23,3% dos casos. A capacidade deste microrganismo de crescer e permanecer viável em plasma humano por um longo período de tempo (Love, 2001), faz da cavidade bucal um reservatório adicional para o microrganismo, além do trato intestinal (Williams *et al.*, 1950).

Em contraste, com os achados da saliva, *Enterococcus faecalis* foi identificado em apenas 3,3% dos casos após o preparo químico-mecânico, não sendo isolado na coleta inicial. A não ocorrência ou a baixa prevalência deste microrganismo em infecções endodônticas primárias foi relatada anteriormente na literatura por diversos autores (Gomes *et al.*, 1994; Molander *et al.*, 1998; Dahlén *et al.*, 2000; Lana *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005; Sedgley *et al.*, 2006). Apesar da baixa prevalência de *E. faecalis* nos canais radiculares analisados no presente estudo, a sua ocorrência foi simultânea na saliva de mesmo paciente. Vale ressaltar que a ocorrência de *E. faecalis* em infecções endodônticas parece estar

relacionada com a presença de infiltração coronária (Kalfas *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006).

A saliva parece ser um dos métodos indicativos mais confiáveis da presença de *Candida* spp. na cavidade bucal (Budtz-Jorgensen, 1974). A presença de *Candida* spp. na cavidade bucal varia de 30% a 45% em pacientes saudáveis (Arendorf & Walker, 1980). Egan *et al.* (2002) relataram a prevalência de *Candida albicans* em 32,7% das amostras analisadas de saliva de pacientes sob tratamento endodôntico. No presente estudo, *Candida albicans* foi identificada em 43,3% das amostras salivares. Entretanto, *C. albicans* foi detectada em apenas 3,3% das amostras coletadas dos canais radiculares. A prevalência de *C. albicans* em infecções endodônticas primárias parece variar entre 1,9% (Wilson & Hail, 1968) e 21% (Baumgartner, 2000). Vale ressaltar que a ocorrência de *C. albicans* no canal radicular foi simultânea na saliva dos pacientes sob terapia endodôntica.

Apesar de *C. albicans*/ *E. faecalis* ter sido coletado dos canais radiculares e da saliva num mesmo paciente, nenhuma associação positiva pode ser estabelecida entre os isolados, devido à limitação da técnica de cultura utilizada; sendo necessária a realização de técnicas moleculares.

Enterobacteria, não encontrada nos canais radiculares analisados, parece não exceder 5% da microflora de canais radiculares infectados (Haapasalo *et al.*, 1983). Todavia, a sua ocorrência em canais radiculares parece estar relacionada com contaminação da solução irrigante ou até mesmo pelo uso prolongado de antibióticos (Haapasalo *et al.*, 1983; Siren *et al.*, 1997). Baixa prevalência de Enterobacteriae (10%) foi encontrada nas amostras coletadas da saliva.

6.1.4. Microbiota após o preparo químico-mecânico

Apesar do uso de técnicas contemporâneas (métodos moleculares) para avaliar a eficácia antimicrobiana dos agentes desinfectantes (Vianna *et al.*, 2006b; Siqueira *et al.*, 2007), estudos realizados através do método de cultura têm demonstrado uma correlação

positiva entre ausência de bactérias nos canais radiculares e um favorável índice de sucesso da terapia endodôntica (Tronstad *et al.*, 1981; Heling & Chandler 1998).

Eliminação completa de microrganismos em canais radiculares infectados é um objetivo claro do tratamento endodôntico (Trope & Bergenholtz, 2002).

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é responsável por promover a maior redução de microrganismos presentes na infecção endodôntica (Byström & Sundqvist, 1981) por agir na luz do canal principal, considerada a área de maior volume do sistema de canais radiculares. Entretanto, debris, restos necróticos e microrganismos estrategicamente localizados no sistema de canais radiculares (no interior dos túbulos dentinários) não alcançados pela ação dos instrumentos endodônticos (Safavi *et al.*, 1990), devem ser removidos, uma vez que estão envolvidos no insucesso endodôntico (Nair *et al.*, 1990). Desta forma, torna-se necessário o uso de uma substância química auxiliar com potente ação antimicrobiana a fim de promover uma maior desinfecção, agindo principalmente no interior dos túbulos dentinários (Byström *et al.*, 1985).

O hipoclorito de sódio, substância química auxiliar mais utilizada como irrigante endodôntico nos dias de hoje (Dunavant *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 2007), apresenta sua atividade antimicrobiana proporcional a sua concentração, a qual varia entre 0,5% à 5,25% (Goldman *et al.*, 1981; Vianna *et al.*, 2004). Sua capacidade antimicrobiana depende da concentração de íons de ácido hipocloroso na solução. Estes por sua vez, inativam enzimas que são essenciais para o metabolismo da célula bacteriana (Baumgartner & Cuenin, 1992).

Mesmo após criteriosa instrumentação mecânica e desinfecção com o uso de NaOCl 2,5%, 13/30 canais radiculares analisados, apresentaram cultura positiva. O isolamento de microrganismos mesmo após o uso de diferentes substâncias químicas auxiliares têm sido relatado na literatura (Byström 1986; Gomes *et al.*, 1996b; Molander *et al.*, 1998; Vianna *et al.*, 2007).

A presença de microrganismos após o preparo químico-mecânico deve-se principalmente a capacidade de determinadas espécies microbianas invadirem túbulos dentinários e canais acessórios (Sholvelton, 1964; Safavi *et al.*, 1990; Sem *et al.*, 1997; Siqueira *et al.*, 1996) permanecendo ali protegidas contra o preparo químico-mecânico, o

qual é efetivo nas camadas superficiais da parede dos canais radiculares (Baker, 1975). Não só a complexidade anatômica e a capacidade de espécies de invadirem túbulos dentinários são responsáveis pela presença de microrganismos após o preparo químico-mecânico, mas também os nutrientes que ali permanecem para a sobrevivência das mesmas (Siqueira & Lopes, 1999).

A capacidade dos microrganismos invadirem os túbulos dentinários é dependente de diversos fatores, dentre eles, o período de infecção; os tipos de microrganismos presentes e a localização destes nos túbulos dentinários (Akapta & Belchman, 1982). Inúmeros fatores de virulência como aderência as células do hospedeiro (Kreft *et al.*, 1992) expressão de proteínas permitindo a sobrevivência da espécie em meios com baixa de nutrientes (Giard *et al.*, 1996 e 1997), habilidade de competir com outras células bacterianas (Gálvez *et al.*, 1991) conferem a determinadas espécies a capacidade de invadir túbulos dentinários (Haapasalo & Ørstavik 1987) e se multiplicarem mesmo após o preparo químico-mecânico.

Após o preparo químico-mecânico, houve redução no número de espécies por canal (média: 0,93). Esta redução pode estar relacionada com a baixa capacidade das espécies de sobreviverem em meios escassos de nutrientes (Sundqvist *et al.*, 1998) e a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio. Microrganismos anaeróbios estritos foram reduzidos em mais de 90% com predomínio de cocos (35,71%) e bacilos Gram-positivos (35,71%); especialmente os facultativos (28,57%).

Byström & Sundqvist (1983) relataram que algumas espécies são facilmente eliminadas após o preparo químico-mecânico, principalmente espécies CO₂-dependentes, como *Capnocytophaga* spp., a qual é dependente de hidrogênio ou de formatos e furomatos para o seu metabolismo energético. No presente estudo, *Capnocytophaga* spp. foi identificada em 9/30 amostras iniciais dos canais radiculares analisadas, entretanto, a espécie não foi identificada após o preparo químico-mecânico.

Streptococcus spp. e *Actinomyces* spp. foram freqüentemente isolados após o preparo químico-mecânico. Gomes *et al.* (1996b) e Lana *et al.* (2001) relataram as duas espécies como sendo freqüentemente isoladas após intervenção endodôntica.

A alta prevalência do gênero *Streptococcus* spp. (Gomes *et al.*, 1996b; Lana *et al.*, 2001; Chavez *et al.*, 2003) pode estar relacionada à sua capacidade de aderir ao colágeno, invadindo os túbulos dentinários e ali permanecerem (Daí *et al.*, 1991).

Actinomyces spp., bacilos Gram-positivos não acidogênicos, sem motilidade, não esporulados e de baixa virulência (Siqueira *et al.*, 2002b) são frequentemente identificados após o preparo químico-mecânico em dentes com infecção endodôntica primária (Vianna, 2006) e até mesmo nos casos de infecções persistentes (Nair *et al.*, 2004). A suposta presença de fimbrias (Fidgor, *et al.*, 1992) pode impedir a sua aderência às paredes dos canais radiculares, os quais podem ser levados para os tecidos periapicais, e lá permanecerem, uma vez que apresentam a capacidade de evadir o sistema imune.

Mudança na microbiota dos canais radiculares antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) pode ser observada entre os gêneros: *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Gemella* spp., *Streptococcus* spp., *Eubacterium* spp. A mudança na microbiota parece estar relacionada à terapia endodôntica, a qual promove alteração no ecossistema radicular, principalmente na anaerobiose, e na interrupção de fatores nutricionais estabelecidos entre espécies bacterianas.

Peptostreptococcus spp. e *Eubacterium* spp. foram menos frequentes após o preparo químico-mecânico, concordando com Byström & Sundqvist (1983) e Gomes *et al.* (1996b).

6.2. EFEITO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SISTÊMICOS SOBRE MICRORGANISMOS

Com o objetivo de determinar padrões de suscetibilidade antimicrobiana de cepas isoladas no presente estudo foi utilizado o teste *Epsilometer* (E-test). Este é um teste comercial, baseado nos princípios de difusão de gradiente antimicrobiano em ágar, como forma de determinação da concentração inibitória mínima.

O E-test, por se tratar de um método qualitativo e quantitativo, apresenta vantagens, por determinar a ação antimicrobiana do antibiótico testado, além de determinar

a concentração inibitória mínima capaz de impedir o crescimento microbiano; uma vez que a fita utilizada apresenta diferentes concentrações do antibiótico. Este método foi utilizado anteriormente em diversos estudos (Citron *et al.*, 1991; Nachnani *et al.*, 1992; Kuriyama *et al.*, 2000a; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003 Vianna, 2006).

O teste de suscetibilidade antimicrobiana está indicado nos casos de necessidade de monitoramento de uma infecção grave em um determinado indivíduo ou no tratamento de uma determinada infecção ao longo da vida; para o monitoramento local e regional de padrões de resistência de espécies disponibilizando um guia para terapia antibiótica empírica; e, para determinar padrões de suscetibilidade de microrganismos à novos agentes antimicrobianos aprovados para o tratamento das infecções (NCCLS 2007). Além de estar indicado em infecções persistentes ao regime terapêutico adequado; nos casos com dificuldade em realizar terapia empírica baseada nos precedentes, assim como, em confirmar terapia apropriada para infecções severas ou para infecções que requerem terapia a longo prazo.

De acordo com NCCLS (2007), os agentes antimicrobianos de primeira escolha para microrganismos anaeróbios são: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, penicilina, clindamicina e metronidazol. Vale ressaltar que todos os antibióticos de primeira escolha foram testados no presente estudo.

Resistência aos antibióticos entre os microrganismos anaeróbios vem aumentando significativamente nos últimos anos (Hecht *et al.*, 1999, Snyderman *et al.*, 1999, Hecht, 2004). Ao compararmos os breakpoints publicados há 10 anos atrás (NCCLS 1997) com os mais atuais (NCCLS 2007) para microrganismos anaeróbios estritos, nos deparamos com os seguintes valores respectivamente: Amoxicilina ($4 \mu\text{g/mL} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$), Amoxicilina + ácido clavulânico ($<2 \mu\text{g/mL} \leq 2 \mu\text{g/mL}$), Clindamicina ($<2 \mu\text{g/mL} \leq 2 \mu\text{g/mL}$), metronidazol ($8 \mu\text{g/mL} \leq 8 \mu\text{g/mL}$). O aumento no padrão de suscetibilidade das espécies aos agentes antimicrobianos está relacionado com o descobrimento e caracterização de múltiplos fenótipos resistentes, os quais podem ser transferidos entre as espécies, conferindo resistência (Hecht, 2004). O uso indiscriminado de antibióticos além de contribuir para a transferência de fenótipos de resistência, ainda são capazes de promover seleção microbiana (Hecht *et al.*, 1999).

Os breakpoints determinados pelo NCCLS podem ser muito restritos para o teste de determinados antibióticos, podendo não atingir níveis ideais da concentração no plasma e nos tecidos, dependendo principalmente do local da infecção ou da concentração da dose administrada (Kuriyama *et al.*, 2000a).

Os padrões de suscetibilidade antimicrobiana estão diretamente relacionados com época e a área geográfica onde são realizados os testes (van Winkelhoff *et al.*, 2005). Desta forma, um dos objetivos da realização do teste de suscetibilidade antimicrobiana no presente estudo foi contribuir para o monitoramento local, periódico e regional quanto ao padrão de suscetibilidade de cepas envolvidas na infecção endodôntica, disponibilizando assim informações para a realização de terapia empírica. Conseqüentemente, para discussão dos padrões de suscetibilidade encontrados nas cepas isoladas no presente estudo, foram utilizados principalmente, os estudos anteriormente realizados em diferentes épocas e mesma localização geográfica (Sousa, 2003; Jacinto *et al.*, 2003; Vianna 2006).

Antibióticos β -lactâmicos, especialmente as penicilinas, pelo fato de atuarem em uma gama de espécies bacterianas, de apresentarem poucos efeitos colaterais e não apresentarem custos elevados são as drogas mais tradicionalmente prescritas como primeira escolha (Kuriyama, 2000a).

Segundo Kuriyama (2000b) a atividade antimicrobiana das penicilinas tem diminuído nas bactérias relacionadas à infecção odontogênica orofacial, assim como *Streptococcus* spp. e bactérias anaeróbias isoladas da cavidade bucal.

A benzilpenicilina (penicilina G), uma das penicilinas naturais mais utilizadas, foi eficaz contra 80,95% das cepas analisadas; entretanto, ao considerar sua via de administração parenteral, esta por sua vez, limita o uso. Desta forma, a opção pela droga no tratamento de infecções dentoalveolares está indicado quando uma rápida concentração da mesma é necessária.

Particularmente, 60% das cepas de *P. intermedia* foram suscetíveis a benzilpenicilina, concordando com os achados de Vianna (2006) ao estudar cepas isoladas em dentes com necrose e lesão perirradicular (60%) e com Jacinto *et al.* (2003) ao estudar cepas isoladas de dentes sintomáticos e assintomáticos com presença de lesão periapical (62,5%). Entretanto, Sousa (2003), ao analisar cepas isoladas de canais radiculares de

dentes com presença de abscesso periapical, relatou 100% de suscetibilidade, considerando mesmo valor para o breakpoint (0,5 µg/mL).

Cepas de *P. prevotti* foram suscetíveis em 75% a benzilpenicilina, em contraste com os achados de Jacinto *et al.* (2003), Sousa (2003) e Vianna (2006) que relataram 100% de suscetibilidade das cepas testadas. Vale ressaltar, que um número pequeno de cepas da espécie *P. prevotti* foram analisadas no presente estudo (n=4) e pelos estudos anteriores em comparação [Jacinto *et al.*, 2003 (n=9); Sousa, 2003 (n=5) e Vianna, 2006 (n=8)]; sendo necessário um maior número de cepas analisadas para o estabelecimento do padrão de suscetibilidade da espécie.

P. micros e *F. nucleatum* foram suscetíveis em 91,66% e 50% a benzilpenicilina, respectivamente. Em contraste com estes resultados, Sousa (2003), Jacinto *et al.* (2003) e Vianna (2006), relataram 100% de suscetibilidade. Variação no percentual de suscetibilidade pode ser atribuída à seleção dos casos (tipo de infecção estudada), assim como, virulência das espécies envolvidas na infecção.

As demais espécies testadas foram 100% suscetíveis a benzilpenicilina, demonstrando sua alta atividade antimicrobiana na infecção de origem endodôntica.

A amoxicilina é o antibiótico mais utilizado nas infecções de origem odontogênicas devido ao seu amplo espectro de ação, ação prolongada e sua alta capacidade de absorção, a qual pode ser administrada por via bucal. Os resultados do presente estudo demonstraram 87,5% de suscetibilidade de todas as cepas testadas ao antibiótico amoxicilina, determinado de acordo com o breakpoint geral do NCCLS 2007. O percentual de suscetibilidade do presente estudo difere do encontrado por Lana *et al.* (2001) (96,3%). Em contraste com estes resultados, 100% das cepas testadas por Sousa *et al.* (2003), Jacinto *et al.* (2003) e Vianna (2006) foram suscetíveis à amoxicilina. Diferença no percentual de suscetibilidade encontrada nos estudos está relacionado com os valores dos breakpoints considerados no presente estudo (0,5 µg/mL) e nos estudos previamente realizados: [Lana *et al.* (2001) – 8,0 µg/mL, Jacinto *et al.* (2003) - ≤ 4 µg/mL, Sousa *et al.* (2003) - ≤ 4 µg/mL, Vianna (2006) – < 3 µg/mL]. Entretanto, ao considerar mesmo breakpoint determinados por estes autores, 100% das espécies testadas no presente estudo seriam suscetíveis à amoxicilina.

P. intermedia foi suscetível em 80% à amoxicilina. Em contraste, Jacinto *et al.* (2003), Sousa (2003) e Vianna (2006) relataram 100% de suscetibilidade das cepas. A variação do MIC entre as cepas testadas foi de 0,016 a 2,0 µg/mL, inferior ao relatado por Jacinto *et al.* (2003), Sousa (2003) e Vianna (2006), cujos valores, variaram entre 0,016 e 3,0 µg/mL. Desta forma, diferença no padrão de suscetibilidade está relacionada ao breakpoint determinado pelos autores. Van Winkelhoff *et al.* (2005) ao compararem o percentual de suscetibilidade entre as cepas de *P. intermedia* isoladas de coletas realizadas na Espanha e na Holanda, considerando Breakpoint 3,0 µg/mL, obtiveram 95,8% e 77,7% das cepas suscetíveis a amoxicilina.

P. micros foi suscetível em 91,66% à amoxicilina, com os respectivos valores de MIC₅₀ 0,023 µg/mL e MIC₉₀ 0,25 µg/mL e com variação individual dos valores de MIC entre 0,023 µg/mL e 2,0 µg/mL. Em contraste, Jacinto *et al.* (2003), Sousa *et al.* (2003) e Vianna (2006) relataram 100% de suscetibilidade das cepas testadas. Vale ressaltar que Jacinto *et al.* (2003) e Vianna (2006) relataram mesmo valor para MIC₅₀ (0,016 µg/mL) e MIC₉₀ (0,064 µg/mL); entretanto, Sousa (2003) encontrou valores mais elevados para MIC₅₀ (0,047 µg/mL) e MIC₉₀ (0,25 µg/mL) ao analisar cepas oriundas de abscessos periapicais. Segundo van Winkelhoff *et al.* (2005), 100% das cepas isoladas de pacientes tanto da Espanha quanto da Holanda foram suscetíveis a amoxicilina, considerando o breakpoint de 3,0 µg/mL.

De acordo com NCCLS 2007, 75% das cepas de *F. nucleatum* foram suscetíveis à amoxicilina, com respectivos valores de MIC₅₀ 0,016 µg/mL e MIC₉₀ 0,75 µg/mL. Valores individuais de MIC, entre as cepas testadas, variaram entre 0,016 – 0,75 µg/mL. Diferentes valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ foram relatados pelos autores: Sousa (2003)- MIC₅₀ = 0,032 µg/mL e MIC₉₀ = 0,047 µg/mL, Jacinto *et al.* (2003) - MIC₅₀ = 0,047 µg/mL e MIC₉₀ = 0,19 µg/mL, Vianna (2006) - MIC₅₀ 0,016 µg/mL e MIC₉₀ = 1,5 µg/mL. Van Winkelhoff *et al.* (2005) ao considerarem breakpoint semelhante ao relatado por Vianna (2006) – 3,0 + 0,5 µg/mL verificou 100% de suscetibilidade das cepas de *F. nucleatum* testadas.

Vale ressaltar, que as demais espécies testadas, foram 100% suscetíveis à amoxicilina.

A associação da amoxicilina ao ácido clavulânico foi 100% eficaz contra todas as cepas testadas, concordando com os achados de Jacinto (2003), Sousa *et al.* (2003) e Vianna (2006), apesar dos diferentes valores de breakpoints determinados pelos autores: Jacinto *et al.* (2003) - $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, Sousa (2003) - $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, Vianna (2006) - $\leq 3,0 + 0,5 \mu\text{g/mL}$. Tal associação foi eficaz mesmo contra cepas resistentes a amoxicilina, revelando ser um potente agente antimicrobiano no tratamento de infecções dentoalveolares.

Eritromicina e a clindamicina têm sido prescritas para pacientes alérgicos à penicilina (Gill & Scully *et al.*, 1990; Sandor *et al.*, 1998).

A clindamicina, droga de primeira escolha atualmente na odontologia para pacientes alérgicos as penicilinas, apresenta efeito bacteriostático, exceto em altas doses, quando se torna bactericida, apresentando excelente ação contra anaeróbios, inclusive os produtores de beta-lactamases (Gill & Scully *et al.*, 1990; Sandor *et al.*, 1998).

O mesmo valor de breakpoint para o antibiótico clindamicina foi publicado no NCCLS no ano de 1997 e 2007 ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$); valor este considerado no presente estudo, e nos estudos de Sousa (2003), Jacinto *et al.* (2003). Entretanto, Vianna (2006) considerou mesmo breakpoint relatado por van Winkelhoff (2005) de $4 \mu\text{g/mL}$.

Clindamicina, potente agente antimicrobiano contra microrganismos anaeróbios estritos (Sandor *et al.*, 1998; Kuriyama *et al.*, 2000a; Kuriyama *et al.*, 2007) foi eficaz contra 100% das cepas de *P. prevotii* e *P. micros* e 81,25% contra as demais cepas analisadas.

A clindamicina vem sendo efetiva contra microrganismos anaeróbios Gram-negativos, particularmente contra bacilos produtores de pigmentos negros (Kuriyama *et al.*, 2000a; Jacinto *et al.*, 2003; Vianna, 2006).

P. intermedia foi suscetível em 70% a clindamicina. Jacinto *et al.* (2003) e Sousa (2003) relataram percentual de suscetibilidade de 87,5% e 100% respectivamente. Vianna (2006) ao considerar breakpoint de $4 \mu\text{g/mL}$ relatou suscetibilidade da espécie em 80%.

No ano de 2003, Sousa e Jacinto *et al.* verificaram 100% de suscetibilidade da espécie *F. nucleatum* a clindamicina. Entretanto, mais recente, Vianna (2006) relatou percentual de suscetibilidade de 56%, com respectivos valores de MIC₅₀ - $0,5 \mu\text{g/mL}$ e MIC₉₀ $60 \mu\text{g/mL}$. Valores individuais de MIC variaram entre 0,23 e $16 \mu\text{g/mL}$. No presente

estudo, 50% das cepas de *F. nucleatum* foram suscetíveis a clindamicina. Valor referente à MIC₅₀ e MIC₉₀, assim como a variação individual do MIC entre as cepas, foram superiores ao relatado por Vianna em 2006.

Devido à propensão dos pacientes em desenvolverem colite associada ao uso da clindamicina, esta droga por sua vez, não tem sido amplamente utilizada nas infecções com intensidades baixas a moderadas. O uso limitado da clindamicina provavelmente se dá em função da sua efetividade contra uma gama diversa de microrganismos (Moenning *et al.*, 1989; Dubreuil *et al.*, 1995; Walker, 2000; Sousa *et al.*, 2003; Jacinto *et al.*, 2003; Vianna, 2006).

A eritromicina apresenta um espectro similar ao das penicilinas G e V, porém não atinge altas concentrações plasmáticas, além de ser menos efetiva contra espécies anaeróbias (Moenning *et al.*, 1989).

O breakpoint da eritromicina contra microrganismos anaeróbios estritos ainda não foi determinado pelo NCCLS. Desta forma, a fim de determinar a suscetibilidade das cepas isoladas, foi considerado o breakpoint de 4 µg/mL, determinados pelos autores Spangler & Apelbaum (1993), posteriormente utilizado por Kuriyama *et al.* (2000a), Sousa *et al.* (2003), Jacinto *et al.* (2003) e Vianna (2006).

Eritromicina tem sido prescrita para pacientes alérgicos à penicilina; entretanto, a não eficácia desta droga contra *Fusobacterium* spp. foi observada por Kuriyama *et al.* em 2000a e 2001. No presente estudo, 50% das cepas de *F. nucleatum* analisadas foram suscetíveis a amoxicilina, próximo do percentual relatado por Vianna em 2006 (56%). Em contraste, Sousa em 2003 relatou apenas 10% de suscetibilidade das cepas analisadas de abscessos periapicais. No mesmo ano, 100% das cepas analisadas por Jacinto *et al.* (2003) foram suscetíveis a droga.

Assim como a eritromicina, o breakpoint para azitromicina ainda não fora determinado pelo NCCLS; desta forma, no presente estudo, foi considerado o valor relatado por van Winkelhoff *et al.* (2005) (≤ 2 µg/mL).

A azitromicina atinge níveis de concentração na corrente sanguínea mais elevados que a eritromicina, sem causar efeitos colaterais no trato gastro-intestinal (Andrade, 2000). A azitromicina foi testada como um substituto da eritromicina, a qual foi efetiva contra a

maioria das cepas analisadas, incluindo 90% das cepas de *P. intermedia* e 50% das cepas de *P. gingivalis*.

Metronidazol, agente antimicrobiano de ação bactericida, foi 100% e 70% eficaz contra cepas de *P. gingivalis* e *P. intermedia* respectivamente, bactericida, vem demonstrando um amplo espectro contra anaeróbios Gram-negativos concordando com demais estudos (van-Steenbergen *et al.*, 1993; Kuriyama *et al.*, 2001).

Vianna (2006) relatou 60% de suscetibilidade das cepas de *P. intermedia*. Valor referente ao MIC₅₀ 0,75 µg/mL e MIC₉₀ 26,0 µg/mL no presente estudo foram superiores mostrado por Vianna (2006) (MIC₅₀ 0,016 µg/mL e MIC₉₀ 1,5 µg/mL). Jacinto *et al.* (2003) relataram 87,5% de suscetibilidade das cepas analisadas, ao considerarem o mesmo breakpoint utilizado no presente estudo; valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ foram 0,016 µg/mL e 16,0 µg/mL respectivamente.

Importante ressaltar que o breakpoint publicado pelo NCCLS de 1997 foi semelhante ao relatado no ano de 2007 para o padrão de suscetibilidade de espécies anaeróbias estritas ao metronidazol.

Cefaclor, pertencente a última geração das cefalosporinas, foi 100% eficaz contra todas as cepas testadas. Sua potente ação antimicrobiana contra bactérias anaeróbias estritas têm sido demonstrado por diversos estudos (Lewis *et al.*, 1993; Jacinto *et al.*, 2003; Kuriyama *et al.*, 2000a; Kuriyama *et al.*, 2001)

Contudo, apesar da amoxicilina ainda exibir uma alta atividade antimicrobiana contra a maioria das espécies anaeróbias estritas envolvidas nas infecções endodônticas, resistência entre elas, particularmente *P. intermedia*, vem aumentando nos últimos anos; gerando necessidade em monitorar o padrão de suscetibilidade das mesmas, considerando uma possível mudança na primeira linha dos agentes antimicrobianos. Amoxicilina + ácido clavulânico demonstrou ser uma boa alternativa no tratamento de infecções endodônticas.

6.3. QUANTIFICAÇÃO DA ENDOTOXINA NOS CANAIS RADICULARES INFECTADOS ANTES E APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO

LPS (fator de virulência), geralmente mencionado como endotoxina, liberado durante a desintegração, multiplicação e morte da bactéria (Dahlén & Bergenholtz, 1980; Silva *et al.*, 2002) tem sido investigado em dentes com necrose pulpar (Dahlén & Bergenholtz, 1980; Horiba *et al.*, 1991; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007).

O presente estudo utilizou o teste cromogênico “limulus amebocyte lysate” (LAL) test QLC-1000, com o objetivo de quantificar endotoxinas antes e após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares com hipoclorito de sódio 2,5%; dado não relatado previamente na literatura.

O teste LAL é um dos mais sensíveis, conhecido por detectar baixas concentrações de endotoxinas (Rojas-Corona *et al.*, 1969; Cooper *et al.*, 1971; Novitsky, 1994) possibilitando a detecção e a quantificação cromogênica de endotoxinas (Khabaz *et al.*, 2000, 2001).

Este método foi utilizado previamente por Khabaz *et al.* (2000, 2001) para a quantificação de endotoxinas presente em lesões cáries de dentes com pulpites reversíveis e irreversíveis, por Jacinto *et al.* (2005) para quantificar endotoxina em canais radiculares de dentes sintomáticos e assintomáticos; e mais recentemente por Vianna *et al.* (2007) para quantificar endotoxinas em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical antes e após o preparo químico-mecânico com clorexidina gel 2% e uso de medicação intracanal por 7 dias.

Uma das desvantagens do teste utilizado é a sensibilidade a outros materiais biológicos além da endotoxina, quando presentes em altas concentrações (Dahlén & Bergenholtz, 1980), tais como proteínas, ácidos nucleicos e peptídeos de bactérias Gram-positivas (Wildefeuer *et al.*, 1974) e presença de exsudato do tipo inflamatório (Sullivan & Watson, 1975). Para evitar tais interferências, diluições seriadas até 10^{-2} , aquecimento à 70 °C (Friberger *et al.*, 1982) assim como a realização do procedimento de spike (adição de uma concentração conhecida de endotoxina de *E. coli*) recomendado pelo fabricante foram realizados.

Para não haver risco de contaminação, a coleta das amostras de endotoxinas antes do preparo químico-mecânico foi realizada previamente à coleta para identificação de microrganismos.

Para a coleta de endotoxina dos canais radiculares foi utilizado 1 cone de papel, previamente esterilizado a 200° C, por 4 horas em estufa, tornando-o apirogênico, como recomendado pelo fabricante. Os demais materiais utilizados são comercializados sob a forma de kit (Limulus Amebocyte Lysate - QLC-1000, Cambrex, Walkersville, USA) que segundo o fabricante, já estão apirogênicos.

Entre os microrganismos anaeróbios, bacilos Gram-negativos, foram os mais freqüentemente identificados, representados em sua maioria pela espécie de *P. intermedia*. Estes apresentam lipopolisacarídeos (LPS) na camada externa da parede celular (Fabricius *et al.*, 1982b; Abou-Rass & Bogen, 1998) que funciona como endotoxina no organismo do hospedeiro (Rietschel & Brade, 1992).

O teste de LAL (QLC1000) foi capaz de detectar endotoxina em 100% das amostras analisadas; cujos valores variaram de 17,00 a 696,00 EU/ml por canal radicular, representados pela mediana de 228,00 EU/ml. Valor superior ao encontrado por Vianna (2006) de 151,61 EU/ml em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical, e dos valores médios de 0,157773 ng/ml (1000 EU/ml \approx 100ng/ml) obtidos por Khabaz *et al.* (2001) em dentes com polpa inflamada; considerados bem inferiores ao encontrado por Jacinto *et al.* (2003).

Diferenças entre as concentrações de endotoxina podem estar relacionadas as diferentes metodologias utilizadas pelos autores durante a coleta das amostras assim como a seleção dos casos. Khabaz *et al.*, (2001) utilizaram extirpadores para quantificar endotoxina em tecidos pulpares de dentes com presença de lesão cariosa diagnosticados como pulpites reversíveis e irreversíveis; Jacinto *et al.* (2003), utilizaram 5 cones de papéis para a coleta das amostras de canais radiculares de dentes sintomáticos e assintomáticos; de acordo com Vianna (2006), ao coletar amostras de dentes com necrose pulpar e presença de lesão perirradicular, o presente estudo, utilizou um único cone de papel apirogênico.

A concentração de endotoxinas nos dentes sintomáticos foram superiores, apresentando diferença estatisticamente significante, as encontradas nos dentes

assintomáticos, concordando com os achados da literatura (Schein & Schilder, 1975; Dhálen & Bergenholtz, 1980; Horiba *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 2000; Jacinto *et al.*, 2003). Isto sugere que a concentração de endotoxinas na polpa deve ultrapassar determinada concentração para que ocorra manifestação clínica aparente. Altas concentrações de endotoxinas têm mostrado ser tóxica aos tecidos contendo fibroblastos, podendo levar a necrose pulpar (Griffie *et al.*, 1980). Particularmente, correlação positiva entre altas concentrações de endotoxina e a presença de dor a percussão foi encontrada.

Correlações positivas entre os níveis de endotoxinas e a presença de sintomatologia provavelmente são decorrentes do seu potencial inflamatório. A liberação de histamina, serotonina, e substâncias tipo polipeptídios, após a injeção de endotoxinas foi reportado na literatura (Kadis & Weinbaum 1971; Weinbaum & Kadis, 1971). Acredita-se que estas substâncias participam na produção da dor (Blechman, 1973). Níveis de endotoxinas parecem ser maiores em dentes com presença de lesão periapical (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1991).

Apesar dos estudos demonstrarem associações diretas e indiretas da concentração de endotoxinas com o processo de reabsorção óssea (Bertolini *et al.*, 1986; Nishihara *et al.*, 1989; Ishimi *et al.*, 1990), não foi possível correlacionar tal achado no presente estudo, uma vez que todos os dentes apresentavam lesões periapicais crônicas. Correlação entre o tamanho da lesão e concentração de endotoxinas nos canais radiculares também não foi encontrada.

Durante o preparo químico-mecânico, níveis significantes de endotoxina (LPS) são liberados na morte e multiplicação de células bacterianas causando uma série de efeitos biológicos (Barthel *et al.*, 1997; McGee *et al.*, 1992). Desta forma, o tratamento endodôntico não deve se propor em apenas reduzir a quantidade de bactérias presente nos canais radiculares, mas também em reduzir a quantidade de endotoxinas. Estudos têm sido realizados em busca de substâncias químicas auxiliares ou medicamentos que sejam capazes de inativar moléculas de LPS presente nos canais radiculares.

Butler & Crawford (1982) relataram que 1 mL de hipoclorito de sódio 0,58% e 2,7% não foram capazes de inativar *in vitro* grandes quantidades de endotoxinas de *E. coli*,

apenas, pequenas proporções da mesma. Buck *et al.*, (2001) relataram pequena ação do hipoclorito de sódio 2,62% sob LPS bacteriano.

Tanomaru *et al.* (2003) e Silva *et al.* (2004) ao avaliarem o efeito do preparo químico-mecânico utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares, dentre elas o hipoclorito de sódio 2,5%, em dentes de cães inoculados com LPS bacteriano (*E. coli*), concluíram que o preparo químico-mecânico não foi capaz de inativar endotoxinas presente os canais radiculares.

Apesar de estudos *in vitro* (Butler & Crawford, 1982) e *in vivo* (Tanomaru *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004) em dentes de cães inoculados com LPS de *E. coli* demonstrarem pequena ou nenhuma ação do hipoclorito de sódio 2,5% sobre as endotoxinas, o preparo químico-mecânico dos canais radiculares com o auxílio do hipoclorito de sódio 2,5%, no presente estudo, foi capaz de reduzir a concentração de endotoxinas em 59,9%.

A baixa capacidade do preparo químico-mecânico em reduzir LPS dos canais radiculares demonstrada no presente estudo não deve ser atribuída apenas à pequena ação neutralizante da substância química auxiliar (NaOCl 2,5%) utilizada, como demonstram os estudos *in vitro* (Butler & Crawford, 1982; Buck *et al.*, 2001), mas também a ineficácia da instrumentação do canal radicular em remover LPS das paredes dentinárias, uma vez que estes podem aderir irreversivelmente à tecidos mineralizados (Barthel *et al.*, 1997), tornando difícil a remoção sem o uso de uma substância quelante, como por exemplo, EDTA (ácido etildiamino tetracético de sódico) utilizado antes da colocação de medicação intracanal e da obturação do sistema de canais radiculares.

Embora o presente estudo tenha demonstrado que o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% foi capaz de reduzir apenas 59,9% do conteúdo de LPS presente nos canais radiculares, sucesso no tratamento de canais radiculares é alcançado na prática endodôntica. Entretanto, alto conteúdo de LPS nos canais radiculares após o preparo químico-mecânico deve ser considerado no desenvolvimento e até mesmo na perpetuação de sintomatologia clínica contribuindo para o insucesso da terapia endodôntica.

7 CONCLUSÃO

Dentre as limitações do presente estudo foi possível concluir:

1. A infecção endodôntica primária caracterizou-se ser do tipo mista e polimicrobiana, com predomínio de microrganismos anaeróbios estritos, principalmente, bacilos Gram-negativos; sendo *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella intermedia* as espécies mais frequentemente isoladas.
2. A presença de sinais e/ou sintomas clínicos mostrou estar relacionado com determinadas espécies tais como *Eubacterium lentum*, *Gemella haemolysans*, *Peptostreptococcus micros* e *Bifidobacterium* spp. comumente isoladas nas amostras analisadas.
3. *Candida* spp. e *Enterococcus* spp. foram mais frequentemente isolados da saliva do que as *Enterobacteria* spp. As espécies *C. albicans* e *E. faecalis* isoladas no canal radicular foram similarmente identificadas na saliva.
4. Mudança na microbiota endodôntica foi encontrada no isolamento de *Peptostreptococcus* spp, *Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Gemella* spp., *Peptostreptococcus micros* e *G.haemolysans*.
5. A droga de primeira escolha na odontologia (amoxicilina) associada ao ácido clavulânico mostrou ser uma potente combinação contra microrganismos envolvidos na infecção de origem endodôntica.

6. Altas concentrações de endotoxinas nos canais radiculares estão relacionadas com a presença de sintomatologia clínica, particularmente com a dor à percussão. O preparo químico mecânico com o auxílio do hipoclorito de sódio 2,5% foi capaz de reduzir a concentração inicial de endotoxinas em todos os canais radiculares, entretanto não foi capaz de eliminá-las.

REFERÊNCIAS

1. Abbot PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J*. 1990; 35: 50-60.
2. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J*. 1998; 31: 39-47.
3. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod*. 1981; 7: 376-7.
4. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *J Dent Res*. 1982; 61:435-8.
5. Aldridge KE, Ashcraft D, Cambre K, Pierson CL, Jenkins SG, Rosenblatt JE. Multicenter survey of the changing *in vitro* antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 1238-43.
6. Aldridge KE, Sanders CV. Susceptibility trending of blood isolates of the *Bacteroides fragilis* group over a 12-year period to clindamycin, ampicillin-sulbactam, cefoxitin, imipenem, and metronidazole. *Anaerobe*. 2002; 8: 301-5.
7. Andrade ED (1999) *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 188p.
8. Andrés MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF. Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998; 42: 3022-3023.
9. Aranki A, Freter R. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr*. 1972; 25: 1329-34.
10. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol*. 1980; 25: 1-10.
11. Arzese AR, Tomasetig L, Botta GA. Detections of tetQ and ermF antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolated from clinical specimens and resident microbiota of humans. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45:577-82.

12. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J.* 1999; 32: 99-102.
13. Bahar H, Torun MM, Demirci M, Kocazeybek B. Antimicrobial resistance and beta-lactamase production of clinical isolates of *Prevotella* and *Porphyromonas* species. *Chemotherapy.* 2005; 51: 9-14.
14. Bahn AN, Shklair IL, Mazarella M, Calandra JC. Incidence of oral group D *streptococci*. *J Dent Res.* 1960; 39: 686-687.
15. Baker KA., Fotos PG. The management of odontogenic infections – a rationale for appropriate chemotherapy. *Dent Clin of North America* 1994; 64: 1233-44.
16. Baquero F, Reig M. Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain. *Eur J Clin Infect Dis.* 1992; 11: 1016-20.
17. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod. J.* 1997; 30: 155-9.
18. Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt, J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J Endod.* 1999; 25: 324-8.
19. Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J. Endod.* 1992; 18: 605-12.
20. Baumgartner JC, Johal S, Marshall JG. Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. *J Endod.* 2007; 33: 48-51.
21. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29: 794-7.
22. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod.* 1987; 13: 147-57.
23. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2000; 26: 695–698.
24. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod.* 2003; 29: 44-7.

25. Baumgartner, JC, Falkler Jr, WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod.* 1991; 17: 380-3.
26. Bealtz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and RDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod.* 2003; 29: 334-7.
27. Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71: 192-96.
28. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Commun Dent. Oral Epidemiol.* 2005; 33: 248-55.
29. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod.* 2003; 29: 334-7.
30. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006; 39: 10-7.
31. Berber, VB. Verificação da redução do *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando difentes substâncias químicas e técnicas de instrumentação. Piracicaba, 2005.109 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
32. Berg JD, Roberts PV, Martin A. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol.* 1986; 60: 213-20.
33. Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth 1. *Odontologisk Revy.* 1974; 25: 347-358.
34. Berger JO, Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res.* 1973; 81: 163-6.
35. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986; 319: 516-8.

36. Bianchini HM. Methods for susceptibility testing in anaerobes: When and how they should be used. *Anaerobe* 1999; 5: 417-420.
37. Biaviti B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. *Bifidobacterium*: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology* 2000; 50: 117-131.
38. Biffi JCG, Rodrigues HH. Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. *Endod oral Dent Traumat.* 1989; 5: 55-61.
39. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *Journal of Applied Bacteriology* 1979; 46: 65-73.
40. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesion. *Int Endod J.* 1999; 32: 204-210.
41. Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with Etest. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 367-70.
42. Brazier JS, Hall V, Morris TE, Gal M, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of Gram-positive anaerobic cocci: results of sentinel study in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 53:224-8.
43. Brown LR Jr., Rudolph CE Jr. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957; 10: 1094-9.
44. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001; 27: 325- 327.
45. Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J endod.* 1982; 8:59-66.
46. 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: 170-5.
47. Byström, A., Happonen RP, Sjögren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled sepsis. *Endod Dent Traumat.* 1987; 3: 58-63.

48. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981; 89: 321-328.
49. 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: 307-12.
50. Card SJ, Sigurdsson A, Orstavik D, Trope M. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *J Endod.* 2002; 28: 779-83.
51. Carlsson J, Frölander F, Sundqvist G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. *Acta Odont Scand.* 1977; 35: 139-145.
52. Carrasco E, Martinez M, Calbacho M, Wilckens M. *In vitro* activity of amoxicillin, tetracyclines, azithromycin, ofloxacin and metronidazole against *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* strains. *Anaerobe.* 1999; 5: 443-445.
53. Carratú P, Amato M, Riccitiello F, Rengo S. Evaluation of leakage of bacteria and endotoxins in teeth treated endodontically by two different techniques. *J Endod.* 2002; 28: 272-275.
54. Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE eds. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 9th edn. USA: Mc Grow-Hill Companies 1995; 1032-1141.
55. Chávez de Paz L, Svensäter G, Dahlén G, Bergenholtz G. Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100: 232-41.
56. Chu FSC, Tsang P, Chow TW, Samaranayake LP. Identifications of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod.* 2005; 31: 424-429.
57. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2197-203.
58. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJC. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2197- 2203.

59. Colak M, Evcil S, Bayindir YZ, Yigit N. The effectiveness of three instrumentation techniques on the elimination of *Enterococcus faecalis* from a root canal: an *in vitro* study.
J Contemp Dent Pract. 2005; 15: 94-106.
60. Coldero LG, McHungh S, Mackeenzie D, Saunders WP. Reduction in intracanal bacteria during root canal preparation with and without apical enlargement. Int Endod J. 2002; 35: 437-446.
61. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. J Endod. 1997; 23: 433-8.
62. Cooper JF, Levin J, Wagner HN. Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods to the detection of endotoxin. J Lab Clin Med Nov. 1971; 78: 138.
63. Couroux PR, Massey VE, Schieven BC, Lannigan R, Hussain Z. Comparison of the E-test reference agar dilution method for susceptibility of Gram-negative anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect disease. 1993; 100: 301-303.
64. Crawford JJ, Sconyers JR, Moriarty JD, King RC, West JF. Bacteremia after tooth extractions studied with the aid of pre-reduced anaerobically sterilized culture media. Appl Microbiol. 1974; 27: 927-32.
65. Cullmann W, Frei R, Krech T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. Chemotherapy. 1993; 39: 169-174.
66. Cunningham MD, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, Aruffo A, Darveau RP. *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides are poorly transferred to recombinant soluble Cd14. Infect Immun. 1996; 64: 3601-3608.
67. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980; 49: 175-7.
68. Cunningham MD, Bajorath J, Somerville JE, Darveau RP. *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide interaction with CD14 implications for myeloid and nonmyeloid cell activation. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1999; 28: 497-504.

69. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980; 59: 1033-40.
70. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8: 375-82.
71. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 309-12.
72. Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman. Prevention of bacterial endocarditis: recommendations by the American Heart Association. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 1448-58.
73. Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nouri S, Newburger JW, Hutto C, Pallasch TJ, Gage TW, Levison ME, Peter G, Zuccaro G Jr. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *JAMA.* 1997; 277: 1794-1801.
74. Dametto, FR. Estudo *in vitro* da antimicrobiana imediata a mediate da clorexidina gel 2% usada como irrigante endodôntico contra *Enterococcus faecalis*. Piracicaba, 2002. 100 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
75. Darveau RP, Cunningham MD, Bailey T, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B. Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and pronome neutrophil adhesion. *Infect Immun.* 1995; 63: 1311-1317.
76. de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod.* 2005; 31: 79-83.
77. Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod.* 1998; 24: 356-8.
78. Drucker DB, Gomes BP, Lilley JD. Role of anaerobic species in endodontic infection. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 220-1.
79. Duerden BI. Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and wales during 1993-1994. *Clin Infect Diseases.* 1995; 20: 180-186.

80. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod. 2006; 32: 527-31.
81. 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: 321-329.
82. Eliopoulos GM.. *Enterococcal endocarditis*. In: Kaye D, ed. *Infective Endocarditis*. New York, USA: Raven Press, 209-23.
83. Engström J. History of mouth-to-mouth respiration. Lakartidningen. 1965; 11: 2462-63
84. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. Odonto Revy. 1964; 15: 87-106.
85. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: *in vivo* study. J Endod. 2004; 30: 84-87.
86. Fabricius L, Dahlén GB, Holm SE, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand J dent Res. 1982b; 90: 200-206 .
87. Fabricius L, Dahlén GB, Ohman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canal after varied times of closure. Scand J Dent. Res. 1982a; 90: 134-144.
88. Falagas ME, McDermott L, Snyderman DR. Effect of pH on *in vitro* antimicrobial susceptibility of the Bacteroides fragilis group. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 2047-9.
89. Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. Etiology. J Endod 1988; 14: 363-71.
90. Felmingham D, Wilson AP, Quintana AI, Gruneberg RN. *Enterococcus* species in urinary tract infection. Clin Infect Dis. 1992; 15: 295-301.
91. Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J endod. 2001; 7: 452-5.

92. Figdor D, Sjögren U, Sörlin S, Sundqvist G, Nair PN. Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7: 129-36.
93. Finegold SM. Editorial. Anaerobe. 1998; 4: 131-2.
94. Fleming P, Feigal RJ, Kaplan EL, Liljewark WF, Little JW. The development of penicillin-resistant oral streptococci after repeated penicillin prophylaxis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990; 70: 440-4.
95. Flynn TR. Severe odontogenic infections. Emerg Med Clin North Am. 2000; 18: 481-519.
96. Foley DB, Weine FS, Hagen JC, deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacterioides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. J Endod. 1983; 9: 236-41.
97. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (1998) *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th edn. St Louis, MO, USA: Mosby, 1079 p.
98. 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: 289-295.
99. Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. Int Endod J. 2001; 34: 506-513.
100. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3223-31.
101. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzappel WH. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol. 2003; 88: 105-22.
102. Friberger P, Knos M, Mellstam LA. A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate. Prog Clin Biol Res. 1982; 93: 195-206.

103. Fujiwara T, Ogawa T, Sobue S, Hamada S. Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. J Gen Microbiol. 1990; 136: 319-326.
104. Fukui H, Brawner B, Bode J, Bode C. Chromogenic endotoxin assay in plasma: selection of plasma, pretreatment and production of standard curves. J Clin Chemist and Clin Bioch. 1989; 27: 941-6.
105. Galvez A, Maqueda M, Martinez-Bueno M, Valdivia E. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. J Bacteriol. 1991; 173: 886-92.
106. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. Lasers Surg Med. 2007; 39: 59-66.
107. Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. Curr Microbiol. 1996; 32: 264-71.
108. Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. Res Microbiol. 1997; 148: 27-35.
109. Gill Y, Scully C. Orofacial odontogenic infections: review of microbiology and current treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990; 70: 155-8.
110. Gold OG, van-Houte J, Van-Houte J. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. Arch Oral Biol. 1975; 20:473-477.
111. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1981;52:197-204.
112. Goldman M, Pearson AH. Post debridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1969; 28: 897-905.
113. Goldstein EJC, Citron DM, Vreni Merriam C, Tyrrell K, Warren Y. Activities of gemifloxacin (SB 265805, LB20304) compared to those of other oral antimicrobial agents against unusual anaerobes. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 2726-30.

114. Goldstein EJC. United States national hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods. *Anaerobe* 1995; 1: 309-14.
115. Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E., Berber, V.B., Teixeira F.B., Souza Filho F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.* 2001; 34: 424-428.
116. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006a; 32: 937-40.
117. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA., Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005b; 20: 211-15.
118. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007. (in press)
119. Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi VP, Zaia AA. Ferraz CC, Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005a; 100: 512-7.
120. Gomes B.P.F.A., Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27: 291-98.
121. Gomes B.P.F.A. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK 1995.
122. Gomes B.P.F.A., Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1996a; 27: 291-298.
123. Gomes B.P.F.A., Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of the root canal microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996b; 29: 235-41.

124. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Sousa-filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004a; 19: 71-76.
125. Grad HA. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan.* 1997; 90: 64-72.
126. Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin Infect Dis.* 1992; 15: 49-7.
127. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect Immun.* 1986; 53: 616-20
128. Griffiee MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. Comparison of bacterial growth in an improperly but commonly used medium versus reduced thioglycolate with the use of an anaerobic sampling technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981; 52: 433-6.
129. Griffiee MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980; 50: 457-61.
130. Groppo FC, del Fiol F, Andrade ED. Profilaxia tratamento das infecções bacterianas. In: *Terapêutica medicamentosa em Odontologia* . São Paulo : Artes Médicas, 2^a ed. 2006:26.
131. Grossman LI, Meiman J. Solutions of pulp tissue by chemical agents. *J Am Dent Assoc.* 1941; 28: 223.
132. Grossman LI. Irrigation of root canals. *J Amer Dent Ass.* 1943; 30: 1915-1917.
133. Haapasalo M, Ørsatavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987; 66: 1375-1379.
134. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand.* 1983; 41: 19-22.
135. Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root infections. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5: 1-10.
136. Haapasalo M., Ranta H., Ranta K., Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun.* 1986; 53: 149-53.

137. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242: 319-24.
138. Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *Int Endod J.* 2001; 34: 463-70.
139. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 92-7.
140. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J.* 1998; 31: 8-14.
141. Helms P. Pulmonary moniliasis; occurrence of *Candida albicans* in expectorate. *Ugeskr Laeger.* 1956; 19: 379-82.
142. Hobson P. An investigation into the bacteriological control of infected root canals. *Brit Dental J.* 1959; 20: 63-70.
143. Hoellman DB, Kelly LM, Jacobs MR, Appelbaum PC. Comparative anti anaerobic activity of BMS 284756. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 589-92.
144. Holland GR, Botero TM, Artley MM, Bayer JR, Nor JE. Production of inflammatory mediators by cultured dental pulp cells in response to lipopolysaccharide. In: General section of the international association for dental research, 81, Gotemburgo, Suécia, Jun. 2003, 1399.
145. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SL, 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: 162-169.
146. 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: 492-5.
147. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from Gram-negative bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg.* 1992; 74: 648-51.

148. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000; 33: 186-93.
149. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH., Akatsu T, Abe E, Nakamura Y. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 1990; 15: 3297-303.
150. Isogai H., Isogai E., Fujii N., Oguma K., Kagota W., Takano K. Histological changes and some *in vitro* biological activities induced by lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene.* 1988; 269: 64-77.
151. Ito HO, Shuto T, Takada H, Koga T, Aida Y, Hirata M, Koga T. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 1996; 41: 439-44.
152. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Sousa-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int. Endod.* 2006; 39:62-70.
153. Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immun.* 2003; 18: 285-292.
154. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 777-783.
155. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8: 175-200.
156. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 462-78.
157. Jhonson CC. Susceptibility of anaerobic bacteria to beta-lactam antibiotics in the United States. *Clin Infect Dis.* 1993; 16: 371-6.

158. Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharides-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003b; 95: 348-54.
159. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday S. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003a; 96: 738-43.
160. Jung ILY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ, Lee CY, Korea S. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *J Endod.* 2001; 92: 329-34.
161. Jung ILY, Choi BK, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000; 26: 599-604.
162. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 1965; 20: 340-349.
163. Kalfas S, Figdor D, Sundqvist G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radidentis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 208-14.
164. Kessler S. Bacteriological examination of root canals. *J Dental Assoc South Africa.* 1972; 27: 9-13.
165. Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. *J Endod* 1976; 2: 146-8.
166. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries association with pulpal pain. *Int Endod J.* 2000; 33:132-137.
167. 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: 587-593.
168. Kho P, Baumgartner JC. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2006; 32: 652-5.

169. King A, Downes J, Nord CE, Philips I. Antimicrobial susceptibility of non-*Bacteroides fragilis* group anaerobic Gram-negative bacilli in Europe. Clin Microbiol Infect. 1999; 5: 404-16.
170. Ko HJ, Lim SS. Production of macrophage inflammatory protein (MIP) - 1 α and MIP-1 β by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. J endod. 2002; 28: 11.
171. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pocket of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. Int Endod J. 1990; 23: 100-106.
172. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, Goldstein EJ, Rodolff AC, Claros M. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to five of the antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother. 2004; 53: 1039-44.
173. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun. 1992; 60: 25-30.
174. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect Immun. 1992; 60: 25-30.
175. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriology and antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17: 132-135.
176. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infection. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000a ; 90: 600-608.
177. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Incidence of β -lactamase production and antimicrobial susceptibility of anaerobic Gram-positive rods isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16: 10-15.

178. Kuriyama T, Nakawaga K, Saiki T, Yamamoto E, Nakamura S. Past administration of β -lactam antibiotics increase in the emergence of β -lactamase producing bacteria in patients with orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000b; 89: 186-92.
179. Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, Yamamoto E, Karasawa T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 285-8.
180. Laghios CD, Cutler CW, Gutmann JL. *In vitro* evidence that lipopolysaccharide of an oral pathogen leaks from root-end filled teeth. *Int Endod J.* 2000; 33: 333-39.
181. Lana MA., Ribeiro-Sobrinho AP, Stehing R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Faarias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16: 100-105.
182. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Maller M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12: 318-322.
183. Leavitt JM, Irvin JN, Srugaevsky P. The bacterial flora of root canals disclosed by a culture medium for endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1958; 11: 302-8.
184. Lewis MAO, Carmichael F, MacFarlane, Milligan SG. A randomised trial of coamoxiclav (Augmentin) Versus penicillin V in the treatment of acute dentoalveolar abscess. *Braz Dent J.* 1993; 175: 169-174.
185. Lewis MAO, McFarlane TW, McGowan DA. Quantitative bacteriology of acute dentoalveolar abscesses. *J Med Microbiol.* 1986; 21: 101-6.
186. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun.* 1997; 65: 5157-64.
187. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34: 399-405.

188. Luderitz O, Galanos C, Rietschel ET. Endotoxin of Gram-negative bacteria. *Pharmacol Ther.* 1981; 15: 383-402.
189. MacDonald JB, Hare GC, Wood AWS. The bacteriological status of the pulp chambers in intact teeth found to be non-vital following trauma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957; 10: 318-22.
190. Mansheim BJ, Onderdonk AB, Kasper DL. Immunochemical and biologic studies of the lipopolysaccharide of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *asaccharolyticus*. *J Immun.* 1978; 120: 72-78.
191. Matto J, Asikainen S, Vaisanen ML, Troil-Linden B, Kononen E, Saarela M. Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella pallens* genotypes and *in vitro* susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2383-8.
192. McDonnell G, Russel AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 147-79.
193. McGee MP, Li LC, Xiong H. Diffusion control in blood coagulation. Activation of factor x by factors IXa/VIIIa assembled on human monocyte membranes. *J Biol Chem.* 1992; 5: 24333-9.
194. McGurkin-Smith R, Trope M, Calplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using Gt rotary instrumentation. 5.24% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod.* 2005; 31: 359-363.
195. McKay TL, Ko J, Bilatis Y, Di Rienzo JM. Mobile genetic elements of *Fusobacterium nucleatum*. *Plasmid.* 1995; 33: 15-25.
196. Miller WD. An introduction to the study of the bacteria pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 1894; 36: 505-528.
197. Moenning JE, Nelson CL, Kohler RB. The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47: 976-85.
198. Molander A, Relf C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.
199. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1996; 74: 1-380.

200. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies. Goteborg, Sweden: Akademiforlaget 1966.
201. Möller AJL, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on Periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in mokeys. Scand J Dent Research. 1981; 89: 475-484.
202. Moraes SR, Siqueira JF Jr., Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of effectiveness of bacterial culture, 16SrDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA Hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. J Endod. 2002; 28: 86-89.
203. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res. 2002; 81: 761-766.
204. Murdoch DA, Mitchelmore IJ, Tabaqchali S. The clinical importance of gram-positive anaerobic cocci isolated at St Bartholomew's Hospital, London, in 1987. J Med Microbiol. 1994; 41: 36-44.
205. Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 81-120.
206. Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesiam AB, Lomeli SL. E-test a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms J Periodontol. 1992; 63: 576-583.
207. Naenni N, Thomaz K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potencial endodontic irrigants. J Endod. 2004; 3: 785-787.
208. Nair PN, Schroeder HE. Pathogenesis of periapical lesions a review of the literature. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15: 348-381.
209. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, 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. 1990; 16: 580-8.
210. National Committee for clinical Laboratory Standarts. Methods for antimicrobial susceptibility testing for anaerobic bacteria 7th edition. Approved standart. NCCLS-

- document M11-A7. Villanova: National committee for clinical laboratory standarts, 2007.
211. National Committee for clinical Laboratory Standarts. Methods for antimicrobial susceptibility testing for anaerobic bacteria 4th edition. Approved standart. NCCLS-document M2-A4. Villanova: National committee for clinical laboratory standarts, 1997.
212. Nelson-Filho P, Leonardo ML, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002; 28: 694-696.
213. Newman M, Kormman K. O uso de antibióticos e antimicrobianos na prática odontológica. São Paulo: Quintessence editora Ltda., 1ª ed. 1997:262..
214. Ngui-Yen JH, Bryce EA, Porter C, Smith JA. Evaluation of the E test by using selected Gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2150-52.
215. Nishihara T, Ishihara Y, Noguchi T, Koga T. Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. *J Immunol.* 1989; 5: 1881-6.
216. Novistiky TJ. Limulus amebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *J Endotox Res.* 1994; 1: 253-63.
217. Nyfors S, Kononen E, Syrjanen R, Komulainen E, Jousimies-Somer H. Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 107-12.
218. Odds FC. Pathogenesis of Candida infections. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 31: 2-5.
219. Ogawa T, Uchida H, Amino K. Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol.* 1994; 140: 1209-1216.
220. Ogawa T, Uchida H. differential induction of IL-1 beta and IL-6 production by the notoxic lipid A from *Porphyromonas gingivalis* in comparison with synthetic *Escherichia coli* lipid A in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immun Medical Microbiol.* 1996; 14: 1-13.
221. Oliveira JCM, Siqueira JF Jr., Alves GB, Hidrata R Jr., Andrade AF. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod.* 2000; 26: 729-732.

222. Oliveira LD, Leao MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. J Dentist. 2005; 33: 107-114.
223. Oliver DE, Shillitoe EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. J Oral Pathol. 1984; 13: 265-70.
224. Önçanğ Ö, Hosgor M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canals irrigants. Int End J. 2003; 36: 423-432.
225. Orrhage K, Nord CE. Bifidobacteria and in human heath. Drugs Experiment Clin Res. 2000; 26: 95-111.
226. Pashley EL. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. J Endod. 1985; 11: 525-8.
227. Pelak BA, Citron DM, Motyl M, Goldstein EJ, Woods GL, Tepler H. Comparative *in vitro* activities of ertapenem against bacteria pathogens from patients with acute pelvic infection. J Antimicrob Chemother. 2002; 50: 735-41.
228. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin, JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts *in vitro*. Arch Oral Biol. 2002; 47: 859-66.
229. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. Int Endod J. 2002; 35:698-702.
230. Poulet PP, Duffaut D, Lodter JP. Evaluation of the E-test for determining the *in vitro* susceptibilities of *Prevotella intermedia* isolates to metronidazole. J Antimicrob Chemother. 1999; 43: 610-1.
231. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Dyke T. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induces different classes of immune responses *in vivo*. J Immun. 2001; 167: 5067-5076.
232. Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7: 1-6.
233. Razavi A, Gmür R, Imfeld T, Zehnder M. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 248-51.

234. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins – An integral part of many bacteria, these molecules are at once brutal and beneficial to humans. Efforts are under way to block the bad effects and harness the good. *Scient Am.* 1992; 32: 26-33.
235. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scient Am.* 1992; 267: 54-61.
236. Rietschel ET, Brader H, Lindner B, Zharinger U. Molecular biochemistry of lipopolysaccharides. In: Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. Morrison D.C., Ryan J.L., editors. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1992, pp. 3-42.
237. Riggio MP, Lennon A, Smith A. Detection of peptostreptococcus micros DNA in clinical samples by PCR. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 249-54.
238. Roberts MC. Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerob.* 2003; 9: 63-5.
239. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 245: 195-203.
240. Rôças IN, Baumgartner JC, Xian T, Siqueira JF. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscess from two geographic locations. *J endod.* 2006:1-4. (*in press*)
241. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. *FEMS Microbiol Lett.* 2005b; 15: 279-85
242. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Occurrence of two newly named oral treponemes – *Teponemas parvum* and *Treponema putidum* – in primary endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005c; 20: 372-375.
243. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. *Lett Appl Microbiol.* 2005a; 41: 12-6.
244. Rôças IN, Siqueira JF Jr., Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections detected by nested PCR. *Int Endod J.* 2003; 36: 20-26.
245. Rôças IN, Siqueira JF. Species directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. *Microbiol.* 2005b; 41:12-16.

246. Rojas CR, *et al.* The limulus coagulation test for endotoxin. A comparison with other assay methods for the detection of endotoxin. *Pro Soc Exp Biol Med.*1969; 132: 599.
247. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Oral Clin Microbiol.* 2001; 39: 3282-3289.
248. Rosenblatt JE, Gustafson DR Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diag Microbiol Int Dis.* 1995; 22: 279-284.
249. Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 435-7.
250. Sabala CL, Powell SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. *J Endod.* 1989; 15: 490-2
251. Safavi KE, Spångberg LSW, Langerland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod.* 1990; 16: 207-210.
252. Saito D, Leonardo RT, Rodrigues JLM, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves R.B. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Medical Microbiol.* 2006; 55: 101-107.
253. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol and Immunol.* 2006; 21: 112-122.
254. Samaranayake, L. P., and T. W. MacFarlane. *Oral candidosis.* 1990 . Wright, Bristol, United Kingdom.
255. Sandor V, Fojo T, Bates SE. Future perspectives for the development of P-glycoprotein modulators. *Drug Resist Updat.* 1998; 1: 190-200.
256. Sands T, Pynn BR. Odontogenic infections and clindamycin. *Univ Tor Dent J.* 1995; 9: 323.
257. Santos *et al.* 2000, Copyright© Medicina on line – Revista Virtual de Medicina. V.1, n.6, Ano I, Out/Nov/Dez, 2000, medonline.com.br/med_ed/med8/edotox.htm.

258. Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 390-7.
259. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 1975; 1: 19-21.
260. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth in 1975. *J Endod.* 2006; 32: 293-5.
261. Schellack G. *Farmacologia na prática clínica da área da saúde.* São Paulo: Fundamento Educacional. 1ª ed. 2004: 190.
262. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *D Clin N Amer.* 1974; 18: 269-296.
263. Scott KP, Melville CM, Barbosa TM, Flint HJ. Occurrence of the new tetracycline resistance gene tet (W) in bacteria from the human gut. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 775-7.
264. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006; 32: 173-77.
265. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 575-83.
266. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994; 78: 634-645.
267. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971; 31: 96-103.
268. Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2006; 32: 110-14.
269. Shepherd MG. Basic mycology. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary oral microbiology and immunology.* St Louis: Mosby; 1992. p. 59-62.
270. Shih M, Marshall FJ, Rosen S. The bacterial efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1970; 29: 613-9.

271. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000; 26: 751-755.
272. Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru-Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004; 15: 109-14.
273. Siqueira JF Jr., Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007; 33: 800-5.
274. Siqueira JF Jr., Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP. Mechanical reduction of bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999; 25: 332-335.
275. Siqueira JF Jr., Lopes, HP. Microbiologia endodôntica. In: Siqueira JF Jr., Lopes, HP. *Endodontia. Biologia e técnica.* Rio de Janeiro: Medsi, 1999.650p.
276. Siqueira JF Jr., Marcelo MD, Fraga FC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on Black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998; 6: 414-16.
277. Siqueira JF Jr., Rôças I.N. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium* and *T. lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Arch Oral Biol.* 2003c; 48: 495-502.
278. Siqueira JF Jr., Rôças IN, Andrade AF, de Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. *J Endod.* 2003; 29: 111-3.
279. 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: 280-284.
280. Siqueira JF Jr., Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002a; 28: 181-184.

281. Siqueira JF Jr., Rôças IN, Souto R, de Uzeda M., Colombo AP. *Actinomyces* species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. J Endod. 2002; 28: 168-72.
282. Siqueira JF Jr., Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. Int Endod J. 2003e; 36: 174-180.
283. Siqueira JF Jr., Rôças IN. Nested PCR detection of *Centipeda periodontii* in primary endodontic infections. J Endod. 2004a; 30: 135-37.
284. Siqueira JF Jr., Rôças IN. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. J Endod. 2003g; 29: 735-38.
285. Siqueira JF Jr., Rôças IN. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA- directed by multiplex PCR. J Endod. 2004b; 30: 851:854.
286. Siqueira JF Jr., Rôças IN. *Treponema socranskii* in endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod. 2003f; 29: 244-247.
287. Siqueira JF Jr., Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3314-3319.
288. Siqueira JF Jr., Rôças IN., Andrade AF, de Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. J Endod. 2003; 29: 111 – 113.
289. Siqueira JF Jr., Uzeda M. Disinfection calcium hydroxide of dentinal tubules infected with two obligates and one facultative anaerobic bacteria . J Endod. 1996; 22: 674-6.
290. Siqueira JF Jr., Uzeda M. Intracanal medication evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. J Endod. 1997; 23: 167-9.
291. Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Santos K. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: A molecular investigation. J Endod. 2004a; 30: 638-643.

292. Siqueira JF, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. 2004b; 19: 363-370.
293. Siqueira JF, Rôças IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod. 2003h; 29: 390-393.
294. Siqueira JF, Rôças IN. Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases. Oral Microbiol Immunol. 2003b; 18: 263-265.
295. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radientis* in primary and persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003d; 96: 215-22.
296. Siqueira JF, Rôças IN. Positive and negative bacteria associations involving *Dialister Pneumosites* in primary endodontic infections. J Endod. 2003i; 29: 438-441.
297. Siqueira JF, Rôças, IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. Dent. 2003a; 31: 333-339.
298. Siqueira JF, Uzeda M. Intracanal medicamentes: evaluation of antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium associated with three vehicles. J Endod. 1997; 3: 167-169.
299. Sirem E, 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: 91-95.
300. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. J Endod. 2005; 31: 669-71.
301. 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: 297-306.
302. Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. Int Endod J. 1988; 21: 277-82.

303. Sjögren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 63: 336-70.
304. Slots J, Taubman MA. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology.* St Louis, Missouri: Mosby Year Book Inc. eds. 1992
305. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Goldstein EJ, Finegold SM, Harrell LJ, Hecht DW, Jenkins SG, Pierson C, Venezia R, Rihs J, Gorbach SL. National survey on the susceptibility of *Bacteroides Fragilis* Group: report and analysis of trends for 1997-2000. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 126-34.
306. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Supran S, Cuchural GJ, Finegold S. Multicenter study of *in vitro* susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group, 1995-1996, with comparison of resistance trends from 1990-1996. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2417-22.
307. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28: 12-55.
308. Soll DR, Galask R, Schmid J, Hanna C, Mac K, Morrow B. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1702-10.
309. Soll DR. *Candida* commensalisms and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Act Trop.* 2002; 81: 101–110.
310. Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1363-9.
311. Sousa EL, Ferraz CC, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 332-339.
312. Sousa ELR. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais/ Ezilmara Rolim de Sousa – Piracicaba, S.P. [s.n.], 2003.
313. Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol.* 2007; 24. (in press).

314. Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1973; 36: 856-71.
315. Spångberg LSM. Endodontic Medicaments. In Smith DC & Williams DF, eds. Biocompatibility of Dental Materials 1 st edn. Boca Raton. USA: CRC Press 1982; 223-257.
316. Spangler SK, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of 201 anaerobes to erythromycin, clarithromycin and roxithromycin by oxryase agar dilution and E-test methodologies. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1366-1367.
317. Steeg PF, Van der Hoeven JS, de Jong MH, van Munster PJ, Jansen MJ. Enrichment of subgingival microflora on human serum leading to accumulation of *Bacteroides* species, Peptostreptococci and Fusobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 1987; 53: 261-72.
318. Strefanopoulos PK, Kolokotronis AE. The clinical significance of anaerobic bacteria in acute orofacial odontogenic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 98: 398-408.
319. Sullivan JD Jr, Watson SW. Purification and properties of the clotting enzyme from *Limulus* lysate. Biochem Biophys Res Commun 1975; 66:848-55.
320. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85: 86-93.
321. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J Endod. 1989; 15: 13-19.
322. Sundqvist G, Reuterving CO. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. J Endod. 1980; 6:602-6.
323. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7:257-262.
324. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Odontological Dissertation n° 7. University of Umea, Sweden 1976.

325. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992a;18:427-430.
326. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994; 78: 522-530.
327. Sundqvist G, Eckerbom ML, Larsson AP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun.* 1979; 25: 685-93.
328. Takada H, Galanos C. Enhancement of endotoxin lethality and generation of an aphyllactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl-dipeptide-treated mice. *Inf Immun.* 1987; 55: 409-413.
329. Takada H, kotani S. Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities. *Crit Rev Microbiol.* 1989; 16: 477-523.
330. Takada H, Kotani S. Structure-function relationship of lipid A. In *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides*. Morrison DC, Ryan JL, editors CRC Press. Inc.108-134.1992.
331. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998; 31: 311-325.
332. Tally FP, Stewart PR, Sutter VL, Rosenblatt JE. Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1975; 1: 161-4.
333. Tanamoto K, Azumi S, Haishima Y, Kumada U. Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol.* 197; 143: 63-71.
334. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho L, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36: 733-739.
335. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB., Anibal EF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35: 735-739.
336. Tanomaru-Filho M, Luis MR, Leonardo MR, Tanomaru JM, Silva LA. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 127-32.

337. Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J.* 2005; 38:285-90.
338. Theron MM, Jansen RMN, Chalkley LJ. Nitromidazole-resistance genes (nimB) in anaerobic Gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.) *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 240-2.
339. Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka, S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J endod.* 2001; 27: 273-7.
340. Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 285-8.
341. Tronstad L, Kreshotool D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 129-136.
342. van Winkelhoff A.J., Carlee A.W., de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect. Immun.* 1985; 49: 494-7.
343. van Winkelhoff AJ, Graff J. Vancomycin as a selective agent for isolation of *Bacteroides* species. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 1282-4.
344. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial Profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherland and Spain. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 893-898.
345. van Winkelhoff AJ, van Steenberg TJM, Graaf J. *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *endodontalis*: Its Role in endodontal infections *J Endod.* 1992; 18: 431-434.
346. van-Steenbergen TJM, van-Winkelhoff AJ, Graaff J, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of black-pigmented Gram-negative anaerobes. *Immun Med Microbiol.* 1993; 6: 229-234.

347. Vianna, ME. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanáis/ Morgana Eli Vianna- Piracicaba, S.P. [s.n.], 2002
348. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Identification and quantification of *Archea* in primary endodontic infections. *J.clin.Microbiol.* 2006a; 1274-1282.
349. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de 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: 79-84.
350. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 411-418.
351. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 253-258.
352. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA., Conrads G. *In vitro* evaluation of Microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int endod J.* 2006b; 39: 484-492.
353. Vianna, ME. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas/ Morgana Eli Vianna – Piracicaba, S.P. [s.n.], 2006.
354. Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, Fowler CB, Bradley DV Jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *J Endod* 1997; 23: 110-114.
355. Villanueva LECP. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 179-183.
356. Wade WG, Lewis MA, Cheeseman SL, Absi EG, Bishop PA. An unclassified *Eubacterium* taxon in acute dento-alveolar abscess. *J Med Microbiol.* 1994; 40:115-7.
357. Wade WG. Non-culturable bacteria in complex commensal populations. *Adv Appl Microbiol.* 2004; 54: 93-106.
358. Walker AA Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Assoc.* 1936; 23: 1418-24.

359. Walker CB, Godowski KC, Borden L, Lennon J, Nango S, Stone C, Garrett S. The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. *J Periodontol.* 2000; 71: 768-74.
360. Walker. Antimicrobial agents and chemotherapy. In: Slots J, Taubman M.A., eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 242-64.
361. Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. *In Vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* 1999; 32: 421-429.
362. Waltimo TM, Sirem E, Torkko H, Olsen I; Haapasalo M. Fungi in therapy resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30: 96-101.
363. Wasfy MO, McMahon KT, Minah GE, Falkler WA Jr. Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 100-5.
364. Waterman PA Jr., Torabinejad M, McMillan PJ, Kettering JD. Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats. *J Endod.* 1998; 85: 720-25.
365. Wexler HM, Molitoris E, Jashnian F, Finegold SM. Comparison of spiral gradient and conventional agar dilution for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 1196-202.
366. Wexler HM. Susceptibility testing of anaerobic bacteria – the state of the art. *Clin Infect Disease.* 1993; 16: 328-S333
367. White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endod.* 1984; 10: 558-62.
368. Wildfeuer A, Heymer B, Schleifer KH, Haferkamp O. Investigation of the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin. *Appl Microbiol* 1974; 28: 867-71.
369. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantification of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32: 715-21.

370. Williams NB, Forbes MA, Blau E, Eichenberg CF. A study simultaneous occurrence of enterococci, lactobacilli and yeasts in saliva from human beings. *J Dent Res.* 1950; 29: 563-570.
371. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 273-275.
372. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. *J Endod.* 1987; 13: 24-28.

APÊNDICES

Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise microbiológica e quantificação de endotoxinas in vivo em canais radiculares infectados antes e após o preparo químico-mecânico", protocolo nº 019/2005, dos pesquisadores BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES e FREDERICO CANATO MARTINHO, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/05/2005.</p>	
<p>The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Microbial analysis and endotoxin quantification in vivo of infected root canal before and after chemo-mechanical procedures", register number 019/2005, of BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES and FREDERICO CANATO MARTINHO, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 10/05/2005.</p>	
 Cinthia Pereira Machado Tabchoury Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>	

Apêndice 2. Aspectos clínicos e radiográficos de 30 dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

Paciente	dente	sexo	Rest.	DE	DP	DAP	DPP	Edema	TL	S/M	EXS	mob	odor	fistula
1	22	M	RD	N	S	S	S	N	15	S	N	N	N	S
2	41	F	RD/C	N	S	S	S	N	10	S	N	N	N	S
3	45	F	RD	N	S	S	S	N	8	S	N	N	N	N
4	31	F	C	N	N	N	N	N	7	S	N	N	N	S
5	21	F	RD	N	N	N	N	N	9	S	N	N	N	S
6	41	F	RP	N	N	N	N	N	6	S	N	S	N	S
7	22	F	RD	N	N	N	N	N	10	S	N	N	N	S
8	34	M	HIG	N	N	N	N	N	10	M	S	S	S	S
9	22	M	RD	N	N	N	N	N	6	S	N	N	S	N
10	11	F	RD/C	N	N	N	N	N	16	S	N	N	S	S
11	21	F	RD	N	N	N	N	N	4	S	N	N	N	N
12	21	M	RD	N	N	S	N	N	8	S	N	N	S	S
13	31	F	RD	N	N	N	N	N	10	S	N	N	N	N
14	31	F	HIG	N	N	N	N	N	4	M	S	N	N	N
15	35	F	C	N	N	N	N	N	10	S	N	N	N	N
16	21	F	RD/C	N	S	S	N	N	8	S	N	N	N	N
17	45	F	C	N	S	N	N	N	9	S	N	N	N	N
18	21	F	RD	N	S	S	S	N	10	S	N	N	N	N
19	22	M	RD	N	S	S	N	N	14	S	N	N	N	N
20	21	M	HIG	N	N	N	N	N	15	S	N	N	N	S
21	35	F	RD	N	N	N	N	N	10	M	S	N	S	N
22	12	F	RD	N	N	N	N	N	19	M	S	N	S	N
23	25	M	RD	N	N	N	N	N	5	S	N	N	N	N
24	22	M	C	N	N	N	S	N	11	S	N	N	N	N
25	22	F	RD	N	N	N	S	N	8	M	S	N	N	N
26	22	F	RD	N	S	N	S	N	8	S	N	N	N	N
27	25	M	C	N	S	N	S	N	7	S	N	N	N	N
28	31	F	HIG	N	N	N	N	N	10	S	N	N	N	N
29	35	F	HIG	N	N	N	N	N	10	S	N	N	N	N
30	25	M	HIG	N	N	N	N	N	5	S	N	N	N	N

Rest = Restauração; HIG = Hígido; RD = Restauração definitiva; RP = Restauração provisória; C = Cariado; DE = Dor espontânea; DP = Dor prévia; DAP = Dor à percussão; DPP = Dor à palpação; Sond = Sondagem periodontal; TL = Tamanho da lesão periapical radiograficamente; S/M = canal seco/molhado – S = Seco, M = Molhado; EXS = Exsudato – P = Purulento, H = Hemorrágico, Cl = Claro; Mob = Mobilidade dentária; S = Sim (presente); N = Não (ausente).

Apêndice 3. Microbiota identificada das amostras coletadas da saliva de 30 pacientes sob tratamento endodôntico.

Caso	Espécies	Caso	Espécies	Caso	Espécies
1	<i>S. oralis</i> <i>S. salivarius</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. mitis 2</i>	11	<i>S. sanguis</i> <i>S. mutans</i> <i>G. morbillorum</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. lentus</i>	21	<i>Lact. Lactis cremoris</i> <i>C. albicans</i> <i>S. oralis</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. mutans</i> <i>S. mitis</i>
2	<i>Neisseria spp.</i> <i>C. albicans</i> <i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. oralis</i>	12	<i>S. mitis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. lentus</i> <i>S. oralis</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. mutans</i>	22	<i>S. mitis</i> <i>E. cloaccae</i> <i>G. morbillorum</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. mutans</i>
3	<i>S. oralis</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. salivarius</i> <i>Lact. Lactis cremoris</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>C. albicans</i> <i>E. cloaccae</i>	13	<i>S. mitis</i> <i>S. salivarius</i> <i>E. faecalis</i> <i>G. morbillorum</i> <i>C. albicans</i>	23	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. oralis</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. constellatus</i> <i>E. faecalis</i>
4	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Lact. lactis cremoris</i> <i>S. oralis</i> <i>S. mitis</i> <i>C. albicans</i> <i>H. parainfluenzae</i>	14	<i>S. mitis</i> <i>G. morbillorum</i> <i>C. albicans</i> <i>Serratia spp.</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>E. faecalis</i>	24	<i>S. oralis</i> <i>S. mitis</i> <i>C. albicans</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. mutans</i> <i>G. morbillorum</i>
5	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>E. faecalis</i> <i>Pasteurella spp.</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. oralis</i> <i>S. mutans</i>	15	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. mitis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>Pasteurella spp.</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. mutans</i>	25	<i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. mitis 1</i> <i>G. morbillorum</i> <i>C. albicans</i> <i>S. sanguis</i>
6	<i>S. mitis</i> <i>S. saliv salivarius</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>Lact. lactis cremoris</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. oralis</i>	16	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>Enterobacteria spp.</i> <i>S. oralis</i> <i>C. albicans</i>	26	<i>S. oralis</i> <i>S. mitis</i> <i>Pasteurella spp.</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>S. lentus</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. oralis</i>
7	<i>C. albicans</i> <i>H. parainfluenzae</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. oralis</i>	17	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. oralis</i> <i>C. albicans</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. mitis 1</i>	27	<i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i> <i>G. morbillorum</i> <i>S. constellatus</i> <i>Aerococcus spp.</i>
8	<i>S. salivarius</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. lentus</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>S. mutans</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. oralis</i>	18	<i>E. faecalis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. mitis</i> <i>S. mitis 1</i>	28	<i>S. oralis</i> <i>S. mutans</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>S. mitis</i> <i>G. morbillorum</i> <i>S. mitis</i>
9	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>E. faecalis</i> <i>Neisseria spp.</i> <i>S. oralis</i> <i>E. faecium</i> <i>S. mitis</i> <i>C. albicans</i>	19	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>C. albicans</i> <i>S. mitis 1</i>	29	<i>S. mutans</i> <i>S. oralis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. mitis 1</i>
10	<i>S. oralis</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. saliv. salivarius</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. lentus</i> <i>S. mitis 1</i>	20	<i>S. saliv. salivarius</i> <i>S. oralis</i> <i>G. haemolysans</i> <i>S. mitis 1</i> <i>S. mitis</i>	30	<i>G. morbillorum</i> <i>S. mutans</i> <i>E. faecalis</i> <i>H. parainfluenzae</i>

Apêndice 4. Identificação microbiológica antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares analisados.

Caso	Antes do preparo químico-mecânico (C1)	Após preparo químico-mecânico (C2)
1	<i>E. limosun, E. letum, P. intermedia, G. haemolysans, Haemophilus spp., P. prevotti.</i>	<i>P. micros, E. lentum</i>
2	<i>P. micros, Capnocytophaga spp., S. salivarius, Veillonella spp.</i>	Não houve crescimento
3	<i>S. mitis, F. mortiferum, G. haemolysans, A. viscosus E. letum, C. bifermentans, P. granulosun, F. nucleatum, P. intermedia.</i>	Não houve crescimento
4	<i>P. micros, P. buccae, P. gingivalis, Neisseria spp., A. naeslundii, P. assacharolytica, G. morbillorum.</i>	<i>A. naeslundii</i>
5	<i>S. mitis, P. intermedia, Capnocytophaga spp., P. gingivalis, P. buccae, P. micros, Eubacterium spp., A. naeslundii.</i>	<i>S. mitis, P. gingivalis, P. buccae, E. faecalis</i>
6	<i>P. intermedia, A. naeslundii, P. micros, S. mitis, S. oralis, P. prevotti.</i>	Não houve crescimento
7	<i>A. israeli, P. micros, C. acetobutyricum, F. necrophorum, S. oralis, H. parainfluenzae, Eubacterium spp.</i>	<i>Eubacterium spp., A. israeli</i>
8	<i>Capnocytophaga spp., Veillonella spp., P. micros, P. gingivalis C. bifermentans, P. intermedia, Neisseria spp.</i>	<i>A. viscosus, P. micros, Neisseria spp.</i>
9	<i>H. parainfluenzae, S. mitis, G. morbillorum, P. micros, P. intermedia, C. albicans.</i>	<i>A. viscosus, S. mitis, H. parainfluenzae.</i>
10	<i>Neisseria spp., P. micros, P. intermedia, S. mitis, A. viscosus Haemophilus spp., Eubacterium spp.</i>	<i>A. viscosus, Haemophilus spp.</i>
11	<i>P. intermedia, P. micros, C. acetobutyricum, G. haemolysans, E. limosun, Capnocytophaga spp.</i>	Não houve crescimento
12	<i>P. intermedia, C. acetobutyricum, P. micros, C. clostridiforme, Veillonella spp., S. mitis 1, Haemophilus spp.</i>	Não houve crescimento
13	<i>G. haemolysans, P. micros, P. prevotti, H. parainfluenzae A. naeslundii, E. letum, A. viscosus</i>	Não houve crescimento
14	<i>P. micros, Neisseria spp., C. clostridiforme, F. varium, A. odontolyticus, P. intermedia, P. oralis</i>	<i>A. meyeri</i>
15	<i>Veillonella spp., Fusobacterium spp., B. ureolyticus, S. constellatus, F. nucleatum, C. bifermentans, P. intermedia, P. micros.</i>	<i>Haemophilus spp.</i>
16	<i>A. naeslundii, P. intermedia, N. subflava, A. viscosus, S. mutans.</i>	<i>A. odontolyticus, G. morbillorum, S. mutans</i>
17	<i>Neisseria spp., Veillonella spp., P. intermedia, S. salivarius, Bifidobacterium spp., A. viscosus, H. parainfluenzae, P. prevotti, H. influenzae.</i>	<i>S. salivarius, S. mitis.</i>
18	<i>Capnocytophaga spp., E. letum, S. mitis 1, P. micros, S. saliv. Salivarius, P. prevotti, P. intermedia, P. oralis, G. haemolysans, S. mutans, S. intermedius.</i>	<i>Neisseria spp., G. haemolysans.</i>
19	<i>P. gingivalis, P. micros, Capnocytophaga spp., F. nucleatum, Clostridium spp., S. mitis, S. oralis, P. endodontalis.</i>	Não houve crescimento
20	<i>P. prevotti, P. micros, A. odontolyticus, P. loescheii, Aerococcus spp., Haemophilus spp.</i>	Não houve crescimento
21	<i>P. intermedia, Bifidobacterium spp., P. micros, E. limosun G. morbillorum, S. saliv. salivarius, S. mutans, S. sanguis.</i>	<i>Haemophilus spp., Propionibacterium spp.</i>
22	<i>Capnocytophaga spp., Neisseria spp., G. morbillorum, Bifidobacterium spp.</i>	Não houve crescimento
23	<i>Capnocytophaga spp., S. mitis, F. varium, C. acetobutyricum, P. prevotti, Propionibacterium spp.</i>	Não houve crescimento
24	<i>B. ureolyticus, G. haemolysans, G. morbillorum, P. oralis Capnocytophaga spp., F. nucleatum, Micrococcus spp.</i>	Não houve crescimento
25	<i>S. constellatus, C. acetobutyricum, P. niegrescens, P. micros.</i>	Não houve crescimento
26	<i>S. mitis, Clostridium spp., H. parainfluenzae, Prevotella spp. B. ureolyticus, Neisseria spp.</i>	Não houve crescimento
27	<i>E. limosun, Lactobacillus spp., G. morbillorum, P. micros, S. mitis, Haemophilus spp.</i>	Não houve crescimento
28	Não houve crescimento	Não houve crescimento
29	Não houve crescimento	Não houve crescimento
30	Não houve crescimento	Não houve crescimento

Apêndice 5. Valores referentes as concentrações inibótiras dos agentes antimicrobianos testados e determinação da resistência (R) ou susceptibilidade (S) das espécies analisadas.

Antibióticos Microorganismo	Amoxicilina		Amoxicilina + Clavulin		Azitromicina		Benzilpenicilina		Clindamicina		Cefaclor		Eritromicina		Metronidazol		Clorafenicol	
<i>Prevotella intermedia</i> (n=10)	0.032	S	0.016	S	0.075	S	2	R	12	R	2	S	0.75	S	26	R	0.50	S
	0.016	S	0.023	S	0.094	S	32	R	16	R	0.19	S	2	S	256	R	3	S
	0.016	S	0.023	S	0.064	S	0.016	S	0.016	S	0.032	S	0.094	S	0.25	S	1.0	S
	0.064	S	0.047	S	0.016	S	0.094	S	0.75	S	0.50	S	0.19	S	3	S	0.75	S
	0.047	S	0.032	S	0.016	S	0.016	S	0.50	S	0.064	S	0.25	S	12	R	1.5	S
	0.016	S	0.047	S	0.064	S	1	R	12	R	1	S	0.032	S	2	S	0.50	S
	2	S	1	S	0.075	S	0.064	S	2	S	0.75	S	1	S	0.25	S	8	R
	0.125	S	0.016	S	0.064	S	0.016	S	2	S	0.50	S	0.25	S	0.75	S	8	R
	0.032	S	0.016	S	0.023	S	0.064	S	0.38	S	0.19	S	0.125	S	0.016	S	0.50	S
0.75	S	0.016	S	8	R	1.5	R	0.50	S	0.25	S	0.016	S	0.75	S	0.50	S	
<i>Peptostreptococcus prevotii</i> (n=4)	0.047	S	0.19	S	0.75	S	0.25	S	0.38	S	1.5	S	0.75	S	192	R	0.75	S
	0.38	S	0.094	S	0.50	S	0.016	S	0.016	S	0.064	S	0.50	S	0.75	S	1.5	S
	0.016	S	0.125	S	1	S	0.50	R	0.50	S	0.75	S	16	R	8	R	12	R
	0.016	S	0.19	S	0.75	S	0.016	S	0.016	S	0.032	S	0.016	S	0.125	S	0.047	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n=4)	0.016	S	0.016	S	0.016	S	1	R	0.25	S	0.047	S	0.25	S	0.032	S	0.75	S
	0.75	S	0.50	S	0.047	S	3	R	256	R	1.5	S	256	R	0.032	S	12	R
	0.25	S	0.19	S	0.016	S	0.047	S	6	R	0.50	S	16	R	0.023	S	0.38	S
	0.032	S	0.016	S	0.016	S	0.023	S	0.50	S	0.016	S	0.016	S	0.016	S	1	S
<i>Fusobacterium varium</i> (n=2)	0.032	S	0.016	S	0.047	S	0.023	S	0.38	S	0.75	S	0.016	S	0.023	S	0.38	S
	0.016	S	0.032	S	0.32	S	0.75	S	0.50	S	0.19	S	0.25	S	0.032	S	1	S
<i>Prevotella buccae</i> (n=2)	0.016	S	0.19	S	0.023	S	0.016	S	0.016	S	0.016	S	0.094	S	0.016	S	0.50	S
	0.023	S	0.19	S	0.047	S	0.012	S	0.023	S	0.016	S	0.047	S	0.094	S	1.5	S
<i>Prevotella oralis</i> (n=2)	0.016	S	0.125	S	0.047	S	0.016	S	0.016	S	0.016	S	0.047	S	0.032	S	0.38	S
	0.19	S	0.064	S	0.25	S	0.047	S	0.032	S	0.125	S	0.75	S	0.016	S	1	S
<i>Peptostreptococcus micros</i> (n=12)	0.016	S	0.19	S	0.75	S	0.064	S	0.38	S	1.5	S	0.25	S	0.50	S	0.75	S
	0.023	S	0.19	S	1.5	S	0.016	S	0.016	S	0.023	S	0.38	S	0.094	S	1.5	S
	0.016	S	0.19	S	0.75	S	0.38	S	0.047	S	0.38	S	0.38	S	48	R	12	R
	0.047	S	0.38	S	0.75	S	0.016	S	0.016	S	0.032	S	0.016	S	0.023	S	0.50	S
	0.016	S	0.19	S	0.75	S	0.25	S	0.50	S	0.19	S	0.50	S	0.032	S	0.023	S
	0.023	S	0.19	S	0.75	S	0.016	S	0.094	S	0.064	S	0.125	S	12	R	4	R
	0.19	S	0.19	S	0.50	S	0.25	S	0.75	S	1.5	S	0.25	S	0.75	S	1.0	S
	0.25	S	0.38	S	0.75	S	0.125	S	0.50	S	0.38	S	0.75	S	8	R	0.016	S
	0.016	S	0.19	S	0.50	S	0.016	S	0.016	S	1	S	0.19	S	0.50	S	0.50	S
	0.047	S	0.125	S	1	S	0.38	S	0.25	S	0.19	S	0.50	S	3	S	0.75	S
	0.016	S	0.19	S	0.75	S	0.19	S	0.016	S	0.023	S	0.38	S	0.125	S	6	R
	2	S	2	S	0.25	S	48	R	1	S	0.125	S	0.50	S	24	R	1.5	S
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (n=4)	0.016	S	0.032	S	256	R	0.016	S	0.38	S	0.047	S	0.25	S	3	S	1.5
0.023		S	0.016	S	1	S	0.094	S	0.75	S	0.016	S	0.75	S	12	R	0.75	S
0.016		S	0.064	S	8	R	0.016	S	3	S	0.023	S	3	S	0.75	S	0.016	S
0.047		S	0.032	S	1	S	0.016	S	0.023	S	0.032	S	0.19	S	0.094	S	0.38	S
<i>Prevotella loeschii</i> (n=1)	0.016	S	0.016	S	0.016	S	0.38	S	0.94	S	0.32	S	0.125	S	0.016	S	0.016	S
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=1)	0.023	S	0.016	S	0.32	S	0.38	S	0.19	S	0.38	S	0.125	S	0.016	S	0.016	S

Apêndice 6. Realização de testes complementares

6.1 Atividade de citocromo oxidase (Koneman EW, 2001)

Qualquer microrganismo que desenvolve atividade de citocromo oxidase (oxidase +) pode ser excluído das Enterobacteriaceae. A reação de cor da atividade de citocromo oxidase deve ser interpretada em 10 a 20 segundos após desenvolvimento, porque muitos microrganismos, como membros selecionados das Enterobacteriaceae, podem produzir reações falso-positivas tardias.

As provas comerciais de citocromo oxidase por gotejamento são utilizadas com mais frequência por serem mais convenientes. As reações de cores são claramente visíveis em 10 segundos. Quando são utilizadas alças metálicas de inoculação para transferir bactéria ao reativo de oxidase, as que são de aço inoxidável ou níquel-cromo podem produzir reações falso-positivas, devido a presença de traços de óxido de ferro na superfície flambada do metal. Esse problema pode ser solucionado mediante o uso de filamentos de plástico ou de platina ou palitos de madeira ou swab. O reativo tetrametil-p-fenilenodiamina é utilizado mais frequentemente que o derivado dimetila por ser mais estável, mais sensível e menos tóxico.

6.2 Redução de nitratos (Koneman EW, 2001)

Todas as Enterobacteriaceae, com exceção de certos biótipos de *Pantoea* (Enterobacter) *agglomerans* e certas espécies de *Serratia* e *Yersinia*, reduzem os nitratos a nitritos. Como o período de incubação necessário para realizar a prova de redução de nitratos é variável (3 a 24 horas, segundo o sistema utilizado), esta prova não é comumente empregada para identificação prévia de isolados bacterianos desconhecidos. No entanto, esse teste é executado na maioria dos laboratórios para confirmar a classificação correta de microrganismos desconhecidos ou como auxiliar para determinar a identificação de espécies de bactérias.

Qualquer meio basal adequado ao crescimento de microrganismos e que contenha 0,1% de nitrato de potássio (KNO₃) pode ser empregado para a realização da prova. O caldo de nitrato e o agar nitrato inclinado são as formas de apresentação do meio mais comumente utilizadas em laboratórios clínicos. Visto que a enzima nitrato redutase tem atividade máxima em condições anaeróbias, ZoBell recomendou o uso de agar semi-sólido. O meio semi-sólido também estimula o crescimento de muitas espécies de bactérias e fornece o ambiente anaeróbio necessário para a ativação da enzima. A adição de pó de zinco a todas as reações negativas, dev ser um procedimento de rotina. A maioria dos microrganismos capazes de reduzir nitratos o faz em 24 horas; alguns podem produzir quantidades detectáveis dentro de 2 horas.

6.3 Teste da catalase

O teste de catalase é utilizado para detectar a presença da enzima catalase, através da decomposição do peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio e água. O peróxido de hidrogênio é formado como produto final de oxidação de aeróbios na quebra do açúcar. Catalase pode tanto promover a decomposição do peróxido de hidrogênio ou até mesmo substratos secundários da oxidação, entretanto, não apresenta efeito na peroxidase (MacFaddin JF, 2000).

A reação da catalase é bem conhecida para diferenciação dos microrganismos gram-positivos. Por exemplo, os streptococci e *Diplococcus pneumoniae*, os quais são catalase negativa, são facilmente distinguidos dos staphylococci e micrococci, fortemente catalase positiva.

A princípio, microrganismos anaeróbios estritos são catalase-negativa, e aeróbios e facultativos são considerados catalase-positiva. Entretanto, tal afirmação, parece não ser absolutamente verdadeira, uma vez que alguns streptococci podem não apresentar catalase-positiva.

Para o teste de catalase parece não haver vantagens no uso de uma concentração mais elevada do que 3% de água oxigenada (Taylor WI & Achanzar D, 1972).

Para a realização do teste de catalase é necessário:

- Utilizar colônias com tempo de incubação de 24-72 horas, preferencialmente de um meio que não contenha sangue. As células vermelhas do sangue possuem catalase podendo interferir no resultado do teste - falso-positivo. É importante resaltar que carboidratos presentes em meios de cultura podem suprimir a atividade da catalase.
- Enconstar no centro da colônia com uma alça estéril e transferir para uma superfície limpa, placa de petri ou lâmina de vidro. Se for o caso de testar colônias isoladas de meio enriquecido com sangue, não encontrar no agar.
- Acrescentar uma gota de H_2O_2 (3%) na colônia. Não introduzir alça metálica na gota despejada sobre a colônia, pois freqüentemente causa uma reação falso-positiva. Verificar o “borbulhamento” imediato. Uma alternativa é colocar peróxido de hidrogênio 15% no crescimento em um meio que não contenha sangue e observar a formação de bolhas.

Interpretação dos resultados: (Summanen P, 1993)

Reação positiva: formação de bolhas imediatas e suspensas a partir do peróxido de hidrogênio.

Reações negativas: não há formação de bolhas. Pode ocorrer formação de poucas bolhas depois de 20 a 30 segundos, sendo considerado o teste catalase negativo; algumas bactérias podem possuir enzimas que não as catalases, as quais podem decompor o peróxido de hidrogênio

6.4 Teste de Fluorescência (Summanen P, 1993)

O uso de sangue de coelho em meios de cultura pode aumentar a detecção de bactérias pigmentadas – *Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp.

Para a realização do teste de fluorescência é necessário:

- É necessário a utilização de uma capela contendo lâmpada UV, para expor a placa contendo as colônias. Especialmente, ao examinar colônias, movimentar a placa contendo até encontrar um ângulo de visão adequado das colônias. Provavelmente, será necessário manter a placa muito próximo da fonte de luz UV, particularmente quando a lâmpada é fraca.
- Colônias foram coletadas da placa, em seguida imersas em metanol num tubo de eppendorf, e posteriormente levadas em UV.
- A fluorescência pode levar alguns segundos para ser revelada.
- Note a presença e cor da fluorescência. Geralmente, é necessário reincubar as placas por muitos dias antes de verificar a fluorescência.

Interpretação dos resultados:

Positiva: “vermelho brick” detectado através da lâmpada de fluorescência. Note que o “vermelho brick” é a única tonalidade de cor confiável na identificação presumtiva de *Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp. Outras espécies anaeróbias podem também apresentar características de fluorescência.

Negativa: mudança na coloração das colônias não é detectada.

Fluorecência dos anaeróbios

Microrganismo	Cor
<i>Porphyromonas asaccharolytica-endodontalis</i>	Vermelho, laranja
<i>P. gingivalis</i>	Ausência de fluorescência
Pigmentado: <i>Prevotella</i> spp.	Vermelho
Bacilo gram-negativo não-pigmentado	Aus. de fluorescência ou pik, laranja, amarelo
<i>Fusobacterium</i> spp	Verde
<i>Veillonella</i> spp	Vermelho
<i>Eubacterium lentum</i>	Vermelho ou aus. de fluorecência
<i>Clostridium difficile</i>	Verde
<i>C. innocum</i>	Verde
<i>C. ramosum</i>	Vermelho

Apêndice 7. Contagem de colônias (UFC/mL)

Para o cálculo do número de colônias presentes nas amostras diluídas, foi aplicada a fórmula descrita a seguir, obtendo o número de bactérias em valores de UFC/mL.

Total de colônias presentes em 1 mL = número de colônias x volume em microlitros dispersado no ágar

(TNC)

1000microlitros (=1 ml)

UFC = TNC presente em 1 mL x número de diluições

Por exemplo: se 4 colônias foram encontradas em 50 mL de uma diluição a 10^{-4}

$$\text{Ex: TNC} = 4 \times 50: 1000 = 80$$

$$\text{UFC} = 80 \times 10000 = 800000 = 8 \times 10^5$$

Apêndice 8. Espectro de ação dos antibióticos testados.

Grupo	Pencilina			Cefalosporina	Macrolídeos		Lincosaminas	Nitromidazólicos
	Benzilpencilina	Amoxicilina	Amoxic + Clavulin	Cefaclor	Eritromicina	Azitromicina	Clindamicina	Metronidazol
Espectro de ação	Pequeno	Estendido	Estendido	Pequeno	Pequeno	Aumentado	Amplo espectro	
Anaeróbios estrictos			*x					x
Anaeróbios facultativos								
Gram-positivo	*x	x	x		x	x	*x	
Gram-negativo	*x	*x	x		*Resistência	*x	x	
Anaeróbios estrictos								
Gram-positivo						*x	*x	
Gram-negativo							*x	
Anaeróbios facultativos								
Gram-positivo							*x	
Gram-negativo								
Coco								
Gram-positivo						*x		
A. facultativo	*x	x	x		x		x	
A. estricto								
Gram-negativo			x	*x				
A. facultativo								
A. estricto	*x	x	x		x		x	
Bacilo			x	*x				
Gram-positivo	*x	x	x		x		x	x
A. facultativo								
A. estricto	*x	x	x		x		x	
Gram-negativo						*Entéricos		
A. facultativo								
A. estricto	*x	x	x		x		x	
Extensão para		<i>H. parainfluenzae</i> <i>Bordorela pertussi</i> <i>Salmonela shigela</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>					

* Espectro de ação específico do agente antimicrobiano.