



MARCOS SERGIO ENDO

**“INVESTIGAÇÃO DE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS EM INFECÇÕES
INTRARRADICULARES ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO TRATAMENTO
ENDODÔNTICO ANTES E APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO”**

PIRACICABA
2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARCOS SERGIO ENDO

**“INVESTIGAÇÃO DE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS EM INFECÇÕES
INTRARRADICULARES ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO TRATAMENTO
ENDODÔNTICO ANTES E APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO”**

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

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA, NA
ÁREA DE ENDODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da
tese defendida pelo aluno Marcos Sergio
Endo, e orientada pela Profa. Dra. Brenda
Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Assinatura do orientador

PIRACICABA
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

En25i Endo, Marcos Sérgio, 1983-
Investigação de microrganismos e endotoxinas em infecções
intrarradiculares associadas ao insucesso do tratamento
endodôntico antes e após o preparo químico-mecânico / Marcos
Sérgio Endo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Retratamento. 3. Infecções bacterianas. 4.
Reação em cadeia da polimerase. 5. Fatores de virulência. I.
Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, 1961- II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Investigation of microorganisms and endotoxins in
intraradicular infections associated with failure endodontic treatment before
and after chemo-mechanical preparation

Palavras-chave em Inglês:

Endodontics

Retreatment

Bacterial infections

Polymerase chain reaction

Virulence factors

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Márcia Carneiro Valera

Flaviana Bombarda de Andrade

Francisco Montagner

Mirian Marubayashi Hidalgo

Data da defesa: 14-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de Dezembro de 2012, considerou o candidato MARCOS SERGIO ENDO aprovado.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Profa. Dra. MARCIA CARNEIRO VALERA

Profa. Dra. FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE

Prof. Dr. FRANCISCO MONTAGNER

Profa. Dra. MIRIAN MARUBAYASHI HIDALGO

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Mário Endo** e **Emília Endo**, e à minha irmã **Marisa Endo** pelo amor incondicional, por lutar com muita garra e honestidade nos momentos de dificuldade e vibrar sempre com as minhas conquistas.
Sou o filho/irmão mais feliz do mundo por ter vocês em minha vida!
Muito obrigado!*

*À minha namorada **Vivian Sayuri Kitayama**, meu presente de Deus que sem você não teria chegado ao final dessa caminhada.
Muito obrigado por todo amor, carinho, atenção e compreensão!*

*À profa. Dra. **Brenda P. F. A. Gomes** pela amizade, oportunidade, bom humor, pelos conselhos e todos os ensinamentos transmitidos.
Muito obrigado!*

AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado, processo nº 2011/50051-5.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa, processo nº 2011/50510-0.

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

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

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

*Aos funcionários **Ana Godoy**, **Daiane Cassiatore**, **Denize Lumena de Pinho**, **Eliane Melo Franco de Souza**, **Eliene Narvaes**, **Geovânia Caldas Almeida**, **Janaina Leite**, **Marco Rapetti**, **Maria Elisa dos Santos**, **Mauro Dias** e os ex-funcionários **Adailton dos Santos Lima**, **Daiane Scutton** e **Wanderly Almeida Pavinatto**.*

À Érica A. Pinho Sinhoreti, Prisilla Zuzi Boldrin, Raquel Q. Marcondes, Roberta Clares Morales dos Santos, Débora Barbeiro e Ana Paula Carone, profissionais da secretaria da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

*Aos professores **Dra. Adriana de Jesus Soares, Dra. Ericka Tavares Pinheiro e Dr. Frederico Canato Martinho** que participaram do processo de qualificação e contribuíram muito no*

*Aos professores, membros titulares da banca examinadora **Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, Dr. Francisco Montagner, Dra. Marcia Carneiro Valera e Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo**, assim como os membros suplentes **Dr. Frederico Canato Martinho, Dra. Mitsue Fujimaki Hayacibara e Caio Cezar Randi Ferraz** que aceitaram prontamente o convite para o enriquecimento dos manuscritos e da tese de Doutorado.*

*Aos **pacientes** que colaboraram e possibilitaram a realização deste trabalho.*

*A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.*

A todos que participaram de forma direta e indireta, contribuindo para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À **DEUS** por me guiar. Só em ti encontro forças para lutar!*

*À família **Endo** pelos ensinamentos de vida e por celebrar todas as minhas conquistas.*

*À família **Kitayama, Jorge Kitayama, Helena Kitayama e Rodrigo Kitayama** pela proteção, pelo carinho e por não medirem esforços para realização de nossos sonhos.*

*Aos meus grandes amigos da Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba **Ariane Cássia Salustiano Marinho, Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Helena Rosa Campos Rabang, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro e Thais Accorsi Mendonça** minha família piracicabana que juntos fizemos nossa história e vocês cuidaram de mim, me deram atenção e tentei fazer o mesmo sem querer nada em troca!*

*À família **Signoretti** pelos maravilhosos momentos juntos e por fazer parte dessa família linda!*

*À amiga **Ana Regina Polay** pela acessoria técnica, pelas inúmeras e agradáveis conversas durante suas vindas à Piracicaba.*

*Aos meus amigos **Ana Raquel Benetti, Ana Regina Casaroto, Ariane Ximenez Graciano, Camila Stadiniski, Carla Klamt, Carla Malcher, Gustavo Cerqueira, Heloisa de Andrade, Hérica Delalibera, Jessica Gerhardt, Juliana Beatriz, Juliana Botelho, Julyano Vieira da Costa, Kelly Micheletti, Luciana Sanches, Luciene Cassia Cruz, Mayko Tanabe, Regiane Teixeira Pereira, Paula Angela Dallazen, Paula Daniele Matheus, Paula Scheibel, Rita de Cássia Maio, Suzana Naomi Matsumoto** que apesar da distância são vocês que me*

transmitem uma energia especial, e nossas amizades apenas se fortalecem. Tenho um carinho imensurável por todos!

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

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Altair Antoninha Del Bel Cury, Célia Marisa Rizzatti Barbosa, Cinthia Machado Tabchoury, Débora Alves Nunes Leite Lima, Eduardo Dias de Andrade, Flávio Henrique Baggio Aguiar, Francisco Carlos Groppo, Glaucia Maria Ambrosano, José Ricardo de Albergaria Barbosa, José Roberto Lovadino, Livia Tenuta, Luciana Asprino, Luís Alexandre Paulillo, Luís Roberto Marcondes, Márcio Casati, Márcio de Moraes, Maria Cristina Volpato, Pedro Luiz Rosalen, Renata Cunha Matheus, Wander José da Silva, pela admiração e convívio agradável durante minha vida acadêmica em Piracicaba.

À todos os colegas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que participaram da minha vida acadêmica: Adriana de Jesus Soares, Ana Carolina Machado Rocha Lima Caiado, Camila Lima, Caroline Odo, Carla Klamt, Carlos Vieira Júnior, Danna Mota Moreira, Douglas Cecchin, Ericka Tavares Pinheiro, Estela Winocur, Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Ezymar Cayana, Flaviana Bombarda de Andrade, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Helena Rosa Campos Rabang, Joelson Brum, Juliana Melo, Juliana Nunes Botelho, Karina Kogo, Karine Schell Nicastro, Livia Aguilera, Livia Forster, Luciana Almeida, Maraísa Greggio Delboni, Marcelo Franchin, Marcos Cunha, Marcos Frozoni, Maria Beatriz D'Arce, Maria Eunice Davidian, Maria Humel, Mariana Agostinho Rodrigues, Mirella Lindoso Gomes Campos, Morgana Vianna, Nádia Fayez, Naelka Sarmento, Neylla Teixeira Senna, Noboru Imura, Patrick Baltieri, Paulo Hemerson de Moraes, Priscila Camondy Bertaglia, Ricardo Ferreira, Rogério de Castilho Jacinto, Shaiana Tashi Kawagoe, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Bellato, Vanessa Berber, e Wanderson Miguel Maia Chiesa, pelo aprendizado e convívio agradável compartilhado nesses anos.

*À todos os **amigos** que passaram pelo Curso de Especialização em Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, do ano de 2007 a 2012, pelos momentos de aprendizado e comemorações.*

*Aos colegas de mestrado **Ana Carolina Pimentel, Aniele Lacerda, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Cimara Barroso Braga Brum, Claudia Suzuki, Érika Clavijo, Thais Duque, Thiago Farias e Tiago Rosa.***

*Aos colegas de doutorado **Ana Carolina Mascarenhas, Carlos Pantoja, Carolina Carvalho de Oliveira, Daniel Rodrigo Herrera, Daniela Miyagaki, Emmanuel da Silva, Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Gabriel Rocha Campos, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Jefferson Marion, Juliana Nagata, Letícia Nóbrega, Máira Prado, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro e Nilton Vivacqua Gomes.***

RESUMO

Introdução: Microrganismos resistentes à terapia endodôntica ou que invadiram o sistema de canais radiculares após os procedimentos clínicos de desinfecção são considerados as principais causas do insucesso endodôntico. **Objetivos:** 1) investigar a prevalência de *Enterococcus faecalis* nos casos de retratamento endodôntico e lesão periapical utilizando a técnica de cultura, PCR tradicional e nested PCR, e avaliar a suscetibilidade antimicrobiana e os fatores de virulência dos *E. faecalis* isolados dos canais radiculares investigados (**Capítulo 1**); 2) quantificar bactérias viáveis e endotoxinas em dentes com infecções endodônticas secundárias e correlacionar seus níveis com aspectos clínicos e radiográficos, e também avaliar o efeito do preparo químico-mecânico (PQM) com clorexidina 2% gel + EDTA 17% na redução de bactérias e endotoxinas. Também visou investigar determinadas espécies bacterianas Gram-negativas por meio da técnica de PCR (**Capítulo 2**). **Métodos:** Amostras microbiológicas foram coletadas de 30 canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical após a remoção da guta-percha (C1) e após o PQM (C2). Técnicas de cultura microbiana, PCR (16S rDNA) e nested PCR foram empregadas para investigação de *E. faecalis*. Determinadas espécies bacterianas Gram-negativas foram investigadas por meio da técnica de PCR. Níveis de endotoxinas e unidades formadoras de colônias (UFCs) foram monitorados em C1 e C2, utilizando o método LAL e cultura, respectivamente. Cepas clínicas de *E. faecalis* foram testadas quanto sua suscetibilidade antimicrobiana frente a 12 tipos de antibióticos por meio do E-test. Fatores de virulência (*efaA*, *ace*, *asa*, *asa373*, *gelE*, *esp* e *cylA*) dos *E. faecalis* isolados foram investigados pela técnica de PCR. **Resultados:** *E. faecalis* foi encontrado pela técnica de cultura (7/30), PCR tradicional (13/30) e nested PCR (23/30). PCR tradicional e nested PCR revelaram maior sensibilidade do que a cultura na detecção de *E. faecalis* ($p<0,05$, teste McNemar). *P. nigrescens* (4/15), *P. intermedia* (2/15), *F. nucleatum* (1/15), *T. denticola* (1/15), *T. socranskii* (1/15) e *T. forsythia* (2/15) foram detectadas nos canais radiculares. Endotoxinas foram detectados em todos os casos (C1 e C2). Correlação positiva entre níveis de endotoxinas e destruição óssea periapical foi observada ($p<0,05$). *E.*

faecalis apresentou-se suscetível frente a Amoxicilina, Amoxicilina + ácido clavulânico, Benzilpenicilina, Moxifloxacina e Vancomicina, entretanto algumas cepas mostraram resistência contra Eritromicina (3/12), Azitromicina (8/12), Rifampicina (4/12), Tetraciclina (2/12) e Doxiciclina (1/12). Foram encontrados os seguintes fatores de virulência nos *E. faecalis* isolados: *ace* e *efaA* (100%), *gelE* (91,6%), *asa* (83,3%), *esp* (25%) e *cylA* (16,6%). **Conclusão: 1)** A percentagem de *E. faecalis* encontrada variou dependendo da técnica empregada. Todos os *E. faecalis* isolados apresentaram fatores de virulência relacionados a aderência (genes *ace* e *efa*). Foi observada resistência frente a alguns antibióticos comumente utilizados na Odontologia **(Capítulo 1); 2)** Foram encontrados microrganismos e endotoxinas em todos os canais radiculares, antes e após o PQM. Os níveis de endotoxinas presentes inicialmente nos canais apresentaram associação com o tamanho da lesão periapical. O PQM com clorexidina 2% gel + EDTA 17% foi efetivo na redução da carga bacteriana e dos níveis de endotoxinas nos casos de infecção endodôntica secundária. **(Capítulo 2).**

Palavras-chaves: Endodontia, periodontite periapical, retratamento, infecções bacterianas, reação em cadeia da polimerase, endotoxinas, fatores de virulência.

ABSTRACT

Introduction: Microorganisms resistant to the endodontic therapy or that invaded the root canal system after clinical disinfection procedures are considered the main causes of endodontic failure. **Aims:** **1)** to investigate the prevalence of *E. faecalis* in cases of endodontic retreatment with periapical lesions using culture technique, traditional PCR and nested PCR; and also to evaluate the antimicrobial susceptibility and virulence factors of *E. faecalis* isolates (**Chapter 1**); **2)** to quantify cultivable bacteria and endotoxin in root canals with secondary endodontic infection correlating their levels with the presence of clinical features; and also to evaluate the effect of chemomechanical preparation (CMP) with 2% chlorhexidine-gel + 17% EDTA on bacterial and endotoxin removal. Moreover, it was also aimed to investigate the presence of target strict Gram-negative anaerobic bacteria by PCR/nested PCR (**Chapter 2**). **Methods:** Microbial samples were collected from 30 root-filled canals of teeth with secondary endodontic infection after removal of gutta-percha (S1) and after CMP (S2). Microbial culture techniques, PCR (16S rDNA) and nested PCR were used to investigate the presence of *E. faecalis*. Target Gram-negative bacterial species were investigated by PCR. Levels of endotoxin and CFU were monitored in S1 and S2, using the LAL assay and culture, respectively. Clinical strains of *E. faecalis* were tested for their antimicrobial susceptibility to 12 types of antibiotics by E-test. The virulence factors (*efaA*, *ace*, *asa*, *asa373*, *gelE*, *esp* and *cylA*) of *E. faecalis* isolates were investigated by PCR technique. **Results:** *E. faecalis* was found by culture technique (7/30), traditional PCR (13/30) and nested PCR (23/30). The traditional PCR and nested PCR technique revealed higher sensitivity for detection of *E. faecalis* than culture ($p < 0.05$, McNemar's test). *P. nigrescens* (4/15), *P. intermedia* (2/15), *F. nucleatum* (1/15) *T. denticola* (1/15) *T. socranskii* (1/15) and *T. forsythia* (2/15) were detected in the root canals investigated. Endotoxins were detected in all cases (S1 and S2). Positive correlation between endotoxin levels and periapical bone destruction was observed ($p < 0.05$). All *E. faecalis* strains were susceptible to Amoxicillin, Amoxicillin + clavulanic acid, Benzylpenicillin, Vancomycin

and Moxifloxacin, however some strains showed resistant to Erythromycin (3/12), Azithromycin (8/12), Rifampicin (4/12), Tetracycline (2/12) and Doxycycline (1/12). The virulence factors of the *E. faecalis* strains were *ace* and *efaA* (100%), *gelE* (91.6%), *asa* (83.3%), *esp* (25%) and *cylA* (16.6%). **Conclusion: 1)** The percentage of *E. faecalis* found varied according to the technique employed. All *E. faecalis* isolated showed virulence factors related to adherence (genes *ace* and *efa*). They also showed resistance to some antibiotics commonly used in dentistry (**Chapter 1**); **2)** Microorganisms and endotoxins were found in all root canals investigated, before and after CMP. The endotoxin levels initially found in the infected root canals were associated with a larger size of periapical radiolucent area. CMP with 2% chlorhexidine-gel + 17% EDTA was effective in reducing both bacterial load and endotoxin contents in the post-treatment apical periodontitis (**Chapter 2**).

Keywords: Endodontics, periapical periodontitis, retreatment, bacterial infections, polymerase chain reaction, endotoxins, virulence factors.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
PROPOSIÇÃO.....	5
CAPÍTULO 1 – Investigation in vivo of <i>Enterococcus faecalis</i> in endodontic retreatment by phenotypic and genotypic methods.....	7
CAPÍTULO 2 – Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation	29
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	51
Justificativa da pesquisa	51
Material e métodos propostos.....	56
Retratamento endodôntico: ação sobre microrganismos e endotoxinas.....	62
Suscetibilidade antimicrobiana dos <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico.....	65
Fatores de virulência dos <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico.....	68
CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE 1 – Coleta das amostras.....	91
APÊNDICE 2 – Meio de transporte.....	101
APÊNDICE 3 – Meios de cultura.....	107
APÊNDICE 4 – Coloração de Gram.....	115
APÊNDICE 5 – Teste da catalase.....	117
APÊNDICE 6 – Kits para identificação microbiana.....	119
APÊNDICE 7 – Extração do DNA microbiano.....	121
APÊNDICE 8 – Métodos para realização das técnicas moleculares de PCR...	123
APÊNDICE 9 – Teste <i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (LAL) Pyrogen-5000.....	129

APÊNDICE 10 – Suscetibilidade antimicrobiana (E-test).....	135
APÊNDICE 11 – Fatores de virulência.....	143
APÊNDICE 12 – Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 30 pacientes com dentes indicados ao retratamento endodôntico.....	151
APÊNDICE 13 – Fatores de virulência de colônias de <i>E. faecalis</i> isoladas do canal radicular de dentes submetidos ao retratamento endodôntico.....	153
APÊNDICE 14 – Produção bibliográfica do aluno.....	155
ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	157

INTRODUÇÃO

Microrganismos resistentes à terapia endodôntica ou que invadiram o sistema de canais radiculares após os procedimentos clínicos de desinfecção são considerados as principais causas do insucesso endodôntico (Kakehashi *et al.*, 1965). Esses microrganismos persistentes sobrevivem, pois nutrientes capazes de favorecer o crescimento destes patógenos residuais irão permanecer multiplicar e restabelecer a contaminação do canal radicular (Gomes *et al.*, 1996a). Após o tratamento endodôntico, a presença de sinais e sintomas clínicos, e a persistência da lesão periapical observada radiograficamente determinam o fracasso da terapia que pode estar relacionado com erros durante o controle asséptico, abertura coronária, odontometria, preparo químico-mecânico, obturação e/ou selamento coronário. Sendo assim, investigar a composição da microbiota persistente, e correlacionar esses achados com os aspectos clínicos e radiográficos é de suma importância para o conhecimento e tratamento dessas infecções.

O método tradicional de cultura microbiana foi amplamente utilizado na investigação da microbiota de dentes com infecção endodôntica secundária. Nesses casos de insucesso endodôntico foi verificado a prevalência de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas e demonstraram nitidamente um número menor de espécies e unidades formadoras de colônias (UFC) quando comparado às infecções endodônticas primárias (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003a,b). *Enterococcus faecalis* foi frequentemente isolado de canais obturados e lesão periapical persistente. A cultura de microrganismos permite a realização de testes de suscetibilidade dos patógenos aos agentes antimicrobianos (Siqueira & Rôças, 2005a) e possibilita o estudo da fisiopatologia das espécies microbianas (Shah & Gharbia, 1993).

O diagnóstico molecular na detecção de microrganismos é baseado na amplificação da região do gene 16S rDNA através da reação em cadeia da enzima polimerase (PCR). Com o advento das técnicas moleculares, ampliaram-se as buscas para o melhor conhecimento da microbiota dos casos de insucesso endodôntico e confirmaram uma infecção polimicrobiana mais complexa, detectando tanto bactérias Gram-positivas

(Sundqvist *et al.*, 1998; Molander *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003b) quanto Gram-negativas (Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Rôças *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2012).

Bactérias Gram-positivas são prevalentes nas infecções endodônticas secundárias (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003a,b). *E. faecalis* é encontrado frequentemente nesses quadros de infecção recorrente. Foi observado que esses microrganismos resistem aos procedimentos clínicos: preparo químico-mecânico e medicação intracanal. *E. faecalis* é capaz de sobreviver em condições ecológicas modificadas no interior do sistema de canais radiculares em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas, além disso invade o interior dos túbulos dentinários e se mantém viável em canais radiculares por um período de 12 meses sem nutrientes adicionais (Sundqvist *et al.*, 1998; Sedgley *et al.*, 2005a). Os enterococos têm um crescente potencial como agentes causadores de sérias infecções embora pouco se saiba sobre a sua virulência. Esta falta de informação pode ser atribuída ao fato destas bactérias, que vivem normalmente como comensais na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, possuírem determinantes virulentos muito sutis que não são facilmente identificados (Shankar *et al.*, 1999). Características que determinam virulência são entre outros: aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória, secreção de produtos tóxicos (Eaton & Gasson, 2001), evasão à resposta imune, além de criarem modificações patológicas (Johnson, 1994). A presença destes fatores torna os microrganismos capazes de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, facilitando assim, a colonização. Dessa forma, necessita-se ainda investigar potenciais fatores de virulência dos *E. faecalis* isolados clinicamente de infecções endodônticas secundárias.

Bactérias Gram-negativas, como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema* spp. foram relatadas nas infecções endodônticas secundárias em maior destaque após o emprego dos métodos moleculares (Gomes *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2008a,b). Estes microrganismos Gram-negativos apresentam como constituinte de membrana externa moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), as quais são responsáveis pela organização e estabilidade bacteriana (Vaara & Nikaido, 1984; Mohammadi, 2011). Mesmo em baixas

concentrações, as moléculas de LPS são consideradas potentes estimuladores da resposta inata do sistema de defesa do hospedeiro (Beutler, 2000; Hong *et al.*, 2004; Martinho *et al.*, 2010a), podendo gerar danos teciduais e destruição óssea (Hong *et al.*, 2004), exercendo assim sua atividade endotóxica. Estudos clínicos revelaram a presença de LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares analisados em dentes com infecções endodônticas primárias e secundárias (Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Endo *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012). Horiba *et al.* (1991) investigaram os níveis de endotoxinas em dentes tratados endodonticamente, utilizando um método semi-quantitativo gel-clot; contudo é necessário trabalhos adicionais empregando métodos que apresentam maior sensibilidade técnica.

Apesar de trabalhos mostrarem que grande parte da microbiota endodôntica primária seja suscetível ao preparo químico-mecânico do canal radicular (Peters *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2007; Martinho *et al.*, 2008), microrganismos podem resistir a essa conduta terapêutica ao desenvolverem respostas adaptativas frente às condições do novo ecossistema endodôntico, e contribuir para a manutenção da resposta inflamatória periapical. Pouco se sabe sobre a suscetibilidade desses microrganismos resistentes, presentes nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, frente a protocolos clínicos de desinfecção durante o retratamento endodôntico. Além disso, nenhum trabalho monitorou nos aspectos microbiológicos e endotóxicos nas diversas fases do retratamento endodôntico.

Uma condição para o sucesso do retratamento endodôntico é realização de uma completa desinfecção dos canais radiculares, os quais foram previamente instrumentados, sofrendo muitas vezes desvios de sua trajetória e permitindo a manutenção da infecção. Desta forma a técnica empregada para a remoção do material obturador e limpeza dos canais é muito importante (Friedman *et al.*, 1990). Foram descritas na literatura várias técnicas para a remoção da guta-percha de dentes tratados endodonticamente incluindo instrumentos manuais, rotatórios, solventes e associações. Entretanto poucos trabalhos na literatura investigaram *in vivo* a efetividade de métodos de remoção de guta-percha e limpeza dos canais radiculares destes dentes através do monitoramento da carga microbiana e de endotoxinas. Essa investigação é extremamente importante na busca do

aperfeiçoamento de técnicas capazes de aumentar as taxas de sucesso e favorecer o reparo periapical.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, tendo como objetivos gerais: **1)** investigar a prevalência de *Enterococcus faecalis* nos casos de retratamento endodôntico e lesão periapical utilizando a técnica de cultura, PCR tradicional e nested PCR; visando também avaliar a suscetibilidade antimicrobiana e os fatores de virulência dos *E. faecalis* isolados (**Capítulo 1**); **2)** quantificar bactérias viáveis e endotoxinas em dentes com insucesso endodôntico e correlacionar seus níveis com aspectos clínicos e radiográficos, e também avaliar o efeito do preparo químico-mecânico com clorexidina 2% gel + EDTA 17% na redução de bactérias e endotoxinas. Também visou investigar determinadas espécies bacterianas Gram-negativas por meio da técnica de PCR (**Capítulo 2**).

PROPOSIÇÃO

Os objetivos de cada capítulo deste exemplar foram:

Capítulo 1:

Investigar a prevalência de *Enterococcus faecalis* nos casos de retratamento endodôntico e lesão periapical utilizando a técnica de cultura, PCR tradicional e nested PCR. Visou também avaliar a suscetibilidade antimicrobiana e os fatores de virulência dos *E. faecalis* isolados.

Capítulo 2:

Quantificar bactérias viáveis e endotoxinas em dentes com insucesso endodôntico e correlacionar seus níveis com aspectos clínico-radiográficos, e também avaliar o efeito do preparo químico-mecânico com clorexidina 2% gel + EDTA 17% na redução de bactérias e endotoxinas. Além disso, visou também investigar determinadas espécies bacterianas Gram-negativas por meio da técnica de PCR.

CAPÍTULO 1

Investigation in vivo of *Enterococcus faecalis* in endodontic retreatment by phenotypic and genotypic methods

ABSTRACT

Aim: The aim of the present study was to investigate the prevalence of *E. faecalis* in root-filled canals with periapical lesions using culture technique and molecular approaches. Moreover, it was evaluated the antimicrobial susceptibility against different antibiotics and the virulence factors of *E. faecalis* isolates. **Methods:** The microbial samples were taken either from thirty root-filled canals after gutta-percha removal. Culture methods and 16s rDNA assay were used to identify *E. faecalis* present in the samples. The antimicrobial susceptibility of *E. faecalis* was determined by MIC values using the E test System and interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. The following antibiotics were used: benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, erythromycin, azithromycin, vancomycin, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin, rifampicin and moxifloxacin. Additionally, cultivable strains of *E. faecalis* were investigated for virulence factors by PCR technique, such as the presence of the virulence genes *efaA*, *ace*, *gelE*, *asa*, *asa373*, *esp*, and *cylA*. **Results:** *E. faecalis* were detected by culture (7/30), traditional PCR assay (13/30) and nested PCR (23/30). Traditional PCR and nestedPCR were significantly more effective than culture in detecting *E. faecalis* ($p < 0.05$, McNemar's test). All tested *E. faecalis* ($n=12$) were highly sensitive to amoxicillin, moxifloxacin, vancomycin, benzylpenicillin and amoxicillin-clavulanic acid. Some strains of *E. faecalis* were resistant against antibiotics such as rifampicin (4/12), tetracycline (2/12), doxycycline (1/12), erythromycin (3/12) and azithromycin (8/12). The genes *efaA* and *ace* were detected from all isolates. The other virulence genes were found in 91.6% (*gelE*), 83.3% (*asa*), 25% (*esp*) and 16.6% (*cylA*) of the *E. faecalis* isolates. Gene encoding adherence factors such as *asa373* was not detected in any isolates. **Conclusions:**

Strains of *E. faecalis* isolated in root-filled canals showed virulence factors related to adherence (genes *ace* and *efa*). They also showed resistance to some antibiotics commonly used in dentistry.

Key words: Antibiotics, antimicrobial susceptibility, endodontic failure, *Enterococcus faecalis*, virulence.

INTRODUCTION

The bacteria remaining in the root canal system after endodontic treatment cause secondary, or persistent, infections (1). These microorganisms may have survived the biomechanical procedures or invaded the canal via coronal leakage of the root filling. Bacterial cultures and molecular studies have confirmed that *Enterococcus faecalis* is one of the most prevalent bacteria found in the root canal after endodontic treatment (2 - 4).

Attention has been turned towards enterococci since 1970's when they were recognized as major nosocomial pathogens causing bacteremia, endocarditis, bacterial meningitis, urinary tract, and various other infections (2). There also increasing evidences of the appearance of antibiotic multiresistant strains. They have also been implicated in endodontic infections and are frequently isolated from root-filled canals of teeth with chronic apical periodontitis (3). *E. faecalis*, intrinsically or via acquisition, may be resistant to a wide range of antibiotics (5), which, if used, may shift the microbiota in favor of *E. faecalis*.

In Dentistry, antibiotics are not generally used to treat chronic infections, such as apical periodontitis, in root-filled teeth (6). Usually, they are applied when patients present with progressive, diffuse swelling and systemic signs of infection including fever, malaise, and lymphadenopathy. Systemic antibiotics may also be used as a prophylactic measure for medically compromised patients. Despite these treatment guidelines, dental practitioners tend to overprescribe antibiotics in their practice, often without sufficient rationale for choosing a particular drug (7). The increasing resistance of bacteria to some widely used antibiotics ensures the need of monitoring susceptibility patterns periodically by using susceptibility tests. The Epsilon test (E test), an agar diffusion susceptibility

test, holds the promise of being accurate and flexible enough to be performed in the most clinical laboratories (8). Thus, it is prudent to study changes in the antimicrobial susceptibilities of endodontic pathogens to facilitate the choice of an appropriate antibiotic when indicated for the treatment of infections.

Virulence factors confer the traits that provide survival advantages to organisms in unusual environments. The characteristics of resistance and the capacity to survive endodontic treatment (9), *E. faecalis* presents virulence factors that, in sufficient concentrations, may enable the microorganism to remain in the root canal and either directly or indirectly inflict damage to the periradicular tissues.

The aim of the present study was to investigate the prevalence of *E. faecalis* in root-filled canals with periapical lesions using culture technique, traditional PCR and nested PCR. Moreover, it was evaluated the antimicrobial susceptibility against different antibiotics and virulence factors of *E. faecalis* isolates.

METHODS

Patient selection

Thirty patients were selected from those who attended the Piracicaba Dental School, SP, Brazil, with a need for nonsurgical endodontic retreatment. The Human Volunteers Research and Ethics Committee of the Piracicaba Dental School approved a protocol describing the specimen collection for this investigation, and all patients signed an informed consent to participate. A detailed medical and dental history was obtained from each patient. Patients who had received antibiotic treatment during the last 3 months or had a general disease were excluded from the study. The age of the patients ranged from 19 to 65 years. All selected teeth had been previously single root-filled and showed radiographic evidence of apical periodontitis. Failure of root canal treatment was determined on the basis of clinical and radiographical examinations. All teeth had been root canal treated filled more than 2 years ago and the patients presented with asymptomatic. All teeth had enough crown structure for adequate isolation with a rubber dam, and showed an absence of periodontal pockets deeper than 4 mm.

Microbial sampling

The teeth were isolated with a rubber dam. The crown and the surrounding rubber dam were disinfected with and the surrounding rubber dam were disinfected with 30% H₂O₂ (v/v) for 30 s followed by 2.5 NaOCl for an additional 30 s. Subsequently, 5% sodium thiosulphate was used to inactivate the disinfectant agents (3, 6, 11, 12). A swab sample was taken from the surface and streaked on blood agar plates to test for disinfection. An access cavity was prepared with sterile high-speed diamond burs under irrigation with sterile physiological solution. Before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected with the same protocol as above and the sterility again checked by taking a swab sample of the cavity surface and streaking onto blood agar plates. Aseptic techniques were used throughout root canal treatment and sample acquisition. The initial samples were collected with three sterile paper points, which were consecutively placed into each canal to the full length of the root, kept in place for 60 s and then pooled in a sterile tube containing 1 mL VMGA III transport medium. The samples were transported to the microbiology laboratory within 15 min to an anaerobic workstation (DonWhitley Scientific, Bradford, UK).

Clinical procedures

The same endodontic specialist performed all retreatments and sampling procedures. The tooth was anesthetized and after accessing the pulp chamber, the root filling materials were removed using crown-down technique. No solvent was used at any time to avoid a negative effect on microbial viability. Radiographs performed in bucco-lingual and mesio-distal directions for each tooth were taken to confirm gutta-percha removal.

Root-filling materials were removed by rotary instrumentation and K-files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in a crown-down technique without the use of chemical solvents. Irrigation with sterile saline solution was performed in order to remove any remaining treatment materials and to moisten the canal prior to sample

collection. A K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) size #15 was used to negotiate the root canal. The working length (full length of the canal) was established radiographically and with the aid of an electronic apex locator (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel). Further close inspection under high magnification with the dental operating microscope (D F Vasconcellos S/A, São Paulo, Brazil) showed complete removal of gutta-percha. After this, microbial samples were taken with three paper points, which were pooled into the VMGA III transport medium.

Microbial culturing and identification

Microbial samples, isolation and speciation were done using advanced microbiologic techniques for anaerobic species.

Inside the anaerobic workstation, the tubes containing the transport medium were shaken in a mixer for 60 s (Agitador MA 162-MARCONI, São Paulo, SP, Brazil). Serial 10-fold dilutions were made up to $1/10^4$ in pre-reduced Fastidious Anaerobe Broth (FAB, Laboratory M, Bury, UK) and 50 μ L of each serial dilution were plated onto several media, as follows: 5% defibrinated sheep blood-FAA Agar (FAA, Laboratory M, Bury, UK) alone, and supplemented with 600 μ L of hemin and 600 μ L of menadione. The plates were incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere for up to 48 hours to allow anaerobic or facultative microorganisms growth. In addition, 50 μ L of initial sample was plated onto m-Enterococcus agar (Difco, Maryland, USA) and Mitis salivarius agar (Difco, Maryland, USA) to increase the chance of finding *Enterococcus faecalis*.

Preliminary characterization of microbial special was based on the features of the colonies (i.e. size, color, shape, high, lip, surface, texture, consistency, brightness and hemolysis), visualized under a stereoscopic lens (Lambda Let 2, Atto instruments Co., Hong Kong) at 16x magnification. Isolates were then purified by subculture, gram-stained, tested for catalase production, and their gaseous requirements established by incubation for 2 days aerobically and anaerobically. Based on this information it was possible to select appropriate procedures for identification of *E. faecalis* using API 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) for streptococci (Gram-positive cocci, catalase-negative). The

detection system API 20 Strep is based on fermentative and biochemical properties of facultative anaerobe microorganisms being identified by standardized enzymatic reactions.

Antimicrobial Susceptibility Test

The antimicrobial susceptibility of isolates was investigated by means of the E test System (AB Biodisk, Solna, Sweden).

The strains of *E. faecalis* isolated ($n=12$), which are facultative anaerobic Gram-positive cocci, were tested for their susceptibility/resistance against 12 antibiotics: benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid, erythromycin, azithromycin, vancomycin, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, moxifloxacin, ciprofloxacin and rifampicin. The E test consists of strips containing different concentration of an antimicrobial agent which can be placed directly on the agar plate. This test was evaluated by using Mueller-Hinton agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) 4 mm thick. Inocula were prepared by suspending growth on plates in Fastidious Anaerobe Broth (Laboratory M, Bury, UK) to a McFarland turbidity of 0.5. Sterile cotton swabs were used to inoculate plates, to which E test strips were then applied within 20 min of inoculation. The surface of the plate was swabbed in three directions to ensure a complete distribution of the inoculum over the entire plate. Plates were incubated in an aerobic incubator for aerobic bacteria (36°C for 24 hours). All the tests were completed in duplicate. The susceptibility result was interpreted by comparing the minimum inhibitory concentrations (MICs) of isolates with MIC interpretive standards established for National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). After 24 hours of incubation in aerobic condition and 10% CO₂ the concentration of the drug that inhibits 90% of bacterial growth in-vitro (MIC) could be easily read from the strip (13).

The E test is based on the diffusion of a continuous, exponential concentration gradient of the antimicrobial from a plastic strip containing the antibiotic. After incubation of the E test strip on agar media with a lawn of bacteria, an ellipse of inhibition is formed around the strip. The point where the ellipse intersects the strip is where the MIC is read from the interpretive scale.

The MICs were read from the intercept where the ellipse inhibition zone intersected with the scale. The MICs including 90 and 50% of the strains were calculated. The diameter of the inhibition zone of each strain was measured and the strains were graded as sensitive (S), intermediate (I) and resistant (R) according to the guidelines of NCCLS (2002)(14).

Bacterial Detection (Polymerase chain reaction - PCR 16S rDNA)

DNA extraction: Microbial DNA from all samples and control sample from *Enterococcus faecalis* (ATCC 4034) were extracted and purified by using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration (absorbance at 260 nm) was determined with a spectrophotometer (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

PCR assay: *E. faecalis* was identified using PCR amplification of signature sequences of the 16S rDNA gene. The oligonucleotide species-specific primers for *Enterococcus faecalis* were 5'-CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G-3' (forward primer) and 5'-CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC-3' (reverse primer), producing a PCR amplicon of 138 bp (15). The PCR reaction was performed in a thermocycler (GenePro, Bioer Technology, Hangzhou, China) at a total volume of 25 µl containing 2.5 µl of 10X *Taq* buffer (1X) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5 µl of dNTP mix (25 µM of each deoxyribonucleoside triphosphate – dATP, dCTP, dGTP and dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.25 µl of 25 mM MgCl₂, 0.25 µl of forward and reverse universal primers (0.2 µM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.5 µl sample DNA, 1.5 µl *Taq* DNA polymerase (1 unit) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 17.25 µl nuclease-free water. Polymerase chain reaction amplification was performed in a DNA thermocycler. The temperature profile for the universal reaction included an initial denaturation step at 95°C for 2 min followed by 36 cycles of a denaturation step at 95°C for 1 min, a primer annealing step at 57°C for 1 min, an extension step at 72°C for 1 min, and a final step at 72°C for 7 min. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and viewed

under ultraviolet transilluminating light. Either positive or negative detection of *E. faecalis* strains was based on the presence of clear bands of expected molecular size.

Nested PCR: DNA isolated from the root canal specimens were first amplified with prokaryotic universal ribosomal 16S and 23S primers (785 and 422 respectively), as described elsewhere (11, 16, 17). The sequence of primers 785 and 422 were GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC (universal primer/16S/785 bp from 5'end/Forward) and GGA GTA TTT AGC TT (universal primer/23S/422 bp from 5'end/Forward), respectively. This amplification included the 16S rDNA and the downstream intergenic spacer region (ISR). Inclusion of the ISR provided an additional check of the specificity of the primers, because the length of this region varies among species. PCR reactions were performed in a total volume of 50 μ L containing 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), 5 μ L of 10X PCR buffer plus 3 mM $MgCl_2$, 0.25 mM of each primer and 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphates. For each sample, 0.5 μ L of extracted DNA was added to the reaction mixture. PCR was also performed using a positive control (0.5 μ L of DNA extracted from the *E. faecalis* strain ATCC 4034) and a negative control (only the reaction mixture without DNA). Samples were subjected to 22 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 42°C for 2 min, and primer extension at 72°C for 3 min, and a final extension of 72°C for 10 min, in a thermocycler (GenePro, Bioer Technology, Hangzhou, China). *E. faecalis* was then identified by a second, nested amplification with species-specific 16S primers paired with a universal primer located in the 23S gene (L189). The sequence of primers species-specific and L189 were GTC GCT AGA CCG CGA GGT CAT GA (*E. faecalis*/16S/Forward) and GGT ACT TAB ATG TTT CAG TTC (universal primer/23S/Forward), respectively. The PCR reaction conditions were as follows: 27 cycles of 94°C for 1 min, 52°C for 2 min, and 72°C for 3 min. Similarly to the first amplification, positive and negative controls were used in the latter PCR reactions. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and viewed under ultraviolet transilluminating light. A positive or negative identification was based on the presence of clear bands of the expected molecular size (831 bp) using a 21-kb lambda DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All assays were repeated, and if the results were not in agreement, they were repeated again.

Detection of virulence genetic determinants: Virulence genes possibly related to the persistence of *E. faecalis* in endodontic infections were analyzed in the 12 *E. faecalis* strains isolated from root-filled canals with periapical lesions. Whole DNA of *E. faecalis* strains was extracted as previously described. PCR assays were applied targeting the virulence determinants of *efaA*, *ace*, *gelE*, *asa*, *asa373*, *esp*, and *cylA* (15) (**Table I**). A 1.5 µL of each DNA (*E. faecalis* isolated) was mixed with 0.25 µL of each respective primer, 0.5 µL of each deoxyribonucleoside triphosphate (0.2 mM), 1.25 µL of 2 mM MgCl₂, 0.125 µL Taq DNA polymerase, 2.5 µL 10X PCR buffer and 18.6 µL nuclease-free water. The PCR conditions were as follows: 2 min of initial DNA denaturation at 95°C, followed by 35 cycles at 94°C for 20 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 1 min. PCR products were separated by electrophoresis by using 1.5% agarose gel containing ethidium bromide and analyzed under ultraviolet light.

Statistical Analysis

Prevalence of *E. faecalis* was recorded as the percentage of cases examined. The effectiveness of culture, traditional PCR and nested PCR to detect *E. faecalis* in clinical samples were also compared. The ability of different techniques to detect *E. faecalis* of the same sample was compared using McNemar's test (SPSS 13.0, SPSS, Chicago, IL) for matched groups. Significance was established at 5% ($p < 0.05$)

RESULTS

Neither microbial growth nor bacterial DNA was observed in any of the sterility check samples.

***E. faecalis* detection by culture, traditional PCR and nested PCR:** Of the 30 root-filled teeth showing periradicular lesion, *E. faecalis* was identified in 7 cases (23.3%) by culture. Two different strains were recovered from 5 canals, comprising 12 strains. Molecular

methods identified *E. faecalis* in 13/30 (43.3%) cases by traditional PCR and 23/30 (76.6%) cases by nested PCR. Traditional PCR and nested PCR were significantly more sensitive than culturing in the detection of *E. faecalis* ($p < 0.05$; McNemar's test). All culture positive cases were also PCR and nested PCR positive.

Antibiotic susceptibility: Twelve strains were investigated for the antimicrobial susceptibility. The values of MIC₅₀ and MIC₉₀ refer to the minimal inhibitory concentration that was effective against 50% and 90% of the tested strains. **Tables II** also show the range of MIC for each antibiotic against the *E. faecalis* strain tested ($n=12$), as well as the susceptibility rate of the strains against each antibiotic according to the susceptibility breakpoints previously determined by the NCCLS criteria. All strains were susceptible to amoxicillin, moxifloxacin, vancomycin, benzylpenicillin and amoxicillin-clavulanic acid. Chloramphenicol and ciprofloxacin were effective against 83.3% and 50% of the strains, respectively. About 33% of the isolates were resistant to rifampicin, 16.7% to tetracycline and 8.3% to doxycycline. *E. faecalis* strains were resistant to azithromycin (66.7%) and erythromycin (25%).

Virulence genetic determinants: The adherence genes *ace* and *efaA* were observed in all isolates tested. Other virulence determinants, i.e., *gelE*, *asa*, *esp* and *cylA* were determined in 91.6%, 83.3%, 25%, and 16.6% of the strains, respectively. The *asa373* gene was not detected in any strain.

DISCUSSION

Enterococcus faecalis in secondary infection

E. faecalis is the most common, and frequently microorganism associated with treatment failures regardless of the detection method (2, 3) because of the following unique characteristics of *E. faecalis*: (a) *Enterococci* are facultative anaerobes, possessing the ability to grow in the presence or absence of oxygen and they survive very harsh environments including extreme alkaline pH (9.6) and salt concentrations (18); (b) *E.*

faecalis has been the ability to compete with other microorganisms, invade dentinal tubules and resist nutritional deprivation (2); (c) unlike other pathogens, *E. faecalis* can colonize the root canal as the only organism (pure culture) and survive without the support of other bacteria (3).

***Enterococcus faecalis* detection**

In the present study the occurrence of *E. faecalis* in root-filled teeth associated with periradicular lesions was detected by culture and traditional PCR (23.3% and 43.3%). Others studies found *E. faecalis* ranging from 0 to 70% by culture (4, 11) and 0 to 90% by PCR (4, 11). Rolph *et al.* (19) have not found *E. faecalis* in any refractory cases using culture or molecular methods. The differences in findings between the present study and the previously studies may be caused by geographic differences, different dietary intake, variations in clinical sampling, and sample analysis methods.

Biochemical test, traditional 16S rDNA PCR and nested PCR got the different results identifying *E. faecalis* in this study. In the present study, *E. faecalis* was recovered from 7/30, 13/30 and 23/30 root-filled canals examined by culture, traditional PCR and nested PCR analyses, respectively, showing a higher sensitivity of the nested PCR technique over the culture for detecting *E. faecalis* from root-filled canal samples. Our results are in agreement with other studies that have demonstrated that molecular biology methods are more effective than culture in detecting enterococci (4, 11). The reason for this finding possibly relies on the detection limit of both techniques used. The sensitivity of culture is approximately 10^4 to 10^5 cells for target species using nonselective media, while for PCR varies from 10 to 10^2 cells depending on the technique used (21). For instance, the nested PCR takes the detection limit down to about 10 cells (11, 21). PCR can detect nonviable or viable but nonculturable cells (VBNC) (22). Enterococcal species can remain metabolically active after ceasing to divide, elude growth in vitro under periods of starvation in a viable but nonculturable cells (VBNC) form, and later resume growth when conditions become more favorable. To evaluate this bacterial state in clinical samples, they targeted mRNA encoding for *pbp5*, an enzyme associated with peptidoglycan synthesis and critical for VBNC survival (23). PCR-based detection methods enable rapid identification

of both uncultivable and cultivable microbial species with high specificity and sensitivity. Conventional PCR assays, however, detect only the presence or absence, rather than the quantity, of a target microorganism (24). Further studies will be done, using quantitative real-time PCR, to quantify the amount of *E. faecalis* in the samples

Antibiotic susceptibility

The E test method was used in the present study because it provides a simple and a rapid method for quantitative susceptibility testing. Moreover, the MICs obtained with this test are generally in very good agreement with those obtained by agar dilution methods, which is the reference method of the NCCLS (12). It is important to periodically cultivate and test the susceptibility of the strains isolated from the root canals with failure of the endodontic therapy, in order to monitor possible changes in the types and antibiotic resistance of microorganisms responsible for failure endodontic treatment. Antibiotics are often prescribed for the adjunctive treatment of acute endodontic infections, with signs of fever, swelling, lymphadenopathy, trismus or malaise in a healthy patient (7). Antibiotics are also more likely to be needed in an immunocompromised (25) patient or a patient in poor health.

The choice of antibiotic is usually based on previously published susceptibility testing and previous clinical success (25). It would be ideal if susceptibility testing could always be undertaken before the prescription of antibiotics. Unfortunately, it usually takes from several days to weeks to cultivate and to do susceptibility tests on bacteria (26).

All *E. faecalis* strains studied were susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, vancomycin and moxifloxacin in accordance with Pinheiro *et al.* (6) and Skucaite *et al.* (27). The MICs of amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid were lower than for benzylpenicillin. These findings are in agreement with previous studies (6, 28), which have found that enterococci are more sensitive to amoxicillin than to benzylpenicillin. The results indicated that *E. faecalis* strains isolated from canals of root filled canals with periapical lesions remain susceptible, in vitro, to amoxicillin. However the presence of enterococcal strains resistant to penicillin has been reported in endodontic

infections (29), which underlines the need to perform as a routine susceptibility tests of these isolates.

The MIC of erythromycin varied between 1 and 16 µg/mL and resistance was verified with three isolates. Eight strains were found to be resistant to azithromycin (3 to >256 µg/mL). The number of resistant strains was higher than values found by Pinheiro *et al.* (6, 28). In this study, 75% of the isolates showed an intermediate pattern against erythromycin. Similar results have been reported by Sedgley *et al.* (10) who have found, amongst 12 oral enterococci, eight (66.6%) with an intermediate pattern. Pinheiro *et al.* (6) found 28.5% *E. faecalis* susceptible by erythromycin and and 14.2% to azithromycin. However, in the present study, none of *E. faecalis* strains were susceptible to erythromycin and azithromycin. Bacterial resistance to these drugs has been increasing over time; which suggests that oral enterococci have become less susceptible. It has been noted that erythromycin is not effective against *E. faecalis*. Kuriyama *et al.* (30) have suggested that erythromycin may be effective against mild or moderate infections in people with penicillin allergies, but it may not be suitable in cases of more severe infection. Azythromycin was tested as a substitute for erythromycin and was found to be less effective against enterococci than erythromycin. Furthermore, the present study showed lower percentage of susceptibility against chloramphenicol, tetracycline and ciprofloxacin when compared with Pinheiro *et al.* (6).

Virulence determinants

***efaA* and *ace*:** All strains in this study possessed genes *efaA* and *ace* related to the adherence factors, corroborating with Zhu *et al.* (31).

The *efaA* gene was previously identified with the use of an antiserum from a patient with *E. faecalis* endocarditis (32). The amino acid sequence of the associated protein, *efaA*, revealed 55 to 60% homology to a group of streptococcal proteins known as adhesins. Thus, it was hypothesized that *efaA* might be functioning as an adhesin in endocarditis. Production of *efaA* by strains of *E. faecalis* is common.

E. faecalis also possesses collagen-binding protein (*ace*), which help it bind to dentin (33). Once available, the starved cells are able to recover by utilizing serum as a nutritional source. Serum, which originates from alveolar bone and the periodontal ligament, also helps *E. faecalis* bind to type I collagen (2).

***gelE*:** The expression of virulence factor *gelE* was identified in almost (91.6%) all *E. faecalis* strains isolated from cases of failure of the endodontic treatment.

Gelatinase (*gelE*) is a hydrophobic metalloprotease with the capacity for cleaving insulin, casein, hemoglobin, collagen, gelatin and fibrin (34). Studies have been performed in an attempt to associate its proteolytic properties to a higher occurrence of enterococci in endocarditis and bacteremia, urinary infections and oral infections (10). Some studies showed that *gelE* enhances biofilm formation by *E. faecalis* (35). Based on in vitro study, biofilm formation and a high expression of *gelE* of *E. faecalis* isolated from the endodontically failed teeth may contribute to the development of apical periodontitis. Furthermore the expression of *gelE* was higher in the biofilm-positive than in biofilm-negative strains ($p < 0.05$) (36).

***asa* and *asa373*:** The presence of the genes in this study showed a similar pattern to that previously reported for endodontic oral strains (31). *Asa* was found in 83.3% of the *E. faecalis* isolated, while *asa373* was not detected in any strain.

Aggregation substance (*asa*) is a pheromone-responsive, plasmid- encoded bacterial adhesin that mediates efficient contact between donor and recipient bacterium, facilitating plasmid exchange. *Asa* was also found to mediate binding to extracellular matrix proteins, including collagen type I. Binding to collagen type I by bacteria may be of particular importance with respect to endodontic infections, since this is the main organic component of the dentin (37).

Asa373, differs in its protein structure from the classic *asa* and was reported to exhibit some moderately conserved amino acid motifs, when its database sequence was compared with those of some other bacterial adhesins.

esp: Coding for surface adhesion was present in 25% of samples in this study.

The enterococci surface protein (*esp*) is encoded by the *esp* gene and may be involved in colonization and persistence of *E. faecalis* during infections (38). Enterococcal gene *esp*, encoding the high-molecular-weight surface protein *esp*, has been detected in abundance among bacteremia and endocarditis isolates, but is rare in stool isolates from healthy individuals (39). It is likely that it mediates the primary interaction of the pathogen with host surfaces during biofilm formation (40).

cylA: In this study, 16.6% of *E. faecalis* strains were determined to carry the *cylA* gene. Cytolysin can induce tissue damage through the lysis of erythrocytes and destruction of host cells. Sedgley *et al.* (15) determined 36% of the *E. faecalis* endodontitis-associated strains to be capable of producing hemolysin. The genes in the *cyl* operon encode cytolysin, where *cylA* is the only reading frame necessary for the expression of component A, a serine protease.

CONCLUSIONS

Strains of *E. faecalis* isolated in root-filled canals showed virulence factors related to adherence. They also showed resistance to some antibiotics commonly used in dentistry.

REFERENCES

1. Byström A, Happonen RP, Sjögren U *et al.* Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol* 1987 3: 58–63.

2. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32:93–8.
3. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36:1–11.
4. Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G *et al.* Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod* 2007 33: 536-40.
5. Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection* 2002 4: 215–24.
6. Pinheiro ET, Gomes BP, Drucker DB *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2004 37: 756-63.
7. Rodriguez- Núñez A, Cisneros-Cabello R, Velasco-Ortega E *et al.* Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society. *J Endod* 2009 35: 1198–203.
8. Sanches ML, Jones RN. E test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application. *Antimicrob Newslett* 1993 8: 1-8.
9. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
10. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:95-101.
11. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008;34:537-40.
12. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6
13. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A *et al.* Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991 29: 2197–2203.

14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2–A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
15. Sedgley CM, Molander A, Flanagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlén G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:10-19.
16. McClellan DL, Griffen AL, Leys EJ. Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2017-9.
17. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82:338-44.
18. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30:315–20.
19. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, Mackenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3282–9.
20. Siqueira JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 2003; 31:333–9.
21. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Topics* 2004; 9:5-14.
22. Signoretto C, Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:1953-9.
23. Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rates in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* 2001; 91:1085–102.
24. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986 –94.
25. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003 29: 44-7.

26. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002 94: 746-55.
27. Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A *et al.* Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod.* 2010 36: 1611-6.
28. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC *et al.* Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003 18: 100-3.
29. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000 15: 309–12.
30. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K *et al.* Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000 90: 600-8.
31. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2010; 36:1950–5.
32. Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 1995; 63:703-706.
33. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:121– 6.
34. Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. Role of the *Enterococcus faecalis* gel E protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol* 2003; 185:3613-3623.
35. Kristich JK, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; 186:154–63.

36. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. J Endod 2011; 37:631-6.
37. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 1993; 4:679-728.
38. Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immunol 2001; 69: 4366-4372.
39. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun 1999; 67:193-200.
40. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immunol 2004; 72: 6032-6039.

Table I. Primers used to detect virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated strains.

Gene	Sequence of primers (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>efaA</i>	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTTCCTTCTTTGGC	688
<i>ace</i>	GGA ATG ACC GAGAAC GAT GGC GCT TGA TGT TGG CCT GCT TCC G	616
<i>gelE</i>	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	405
<i>asa</i>	CCA GCC AAC TAT GGC GGA ATC CCT GTC GCA AGA TCG ACTGTA	529
<i>asa373</i>	GGACGCACGTACACAAAGCTAC CTGGGTGTGATTCCGCTGTTA	619
<i>esp</i>	TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA	933
<i>cylA</i>	GAC TCG GGG ATT GAT AGG C GCT GCT AAA GCT GCG CTT AC	688

bp, base pairs

Table II Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* (n=12) strains isolated from root-filled canals to twelve antibiotics.

Antibiotics	MIC (µg/mL)			Susceptibility rate (%)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range of MIC (µg/mL)	S	I	R
Amoxicillin	0.315	0.75	0.094-1	100.0%	-	-
Rifampicin	2	12	1-32	16.7%	50.0%	33.3%
Moxifloxacin	0.38	1.5	0.094-1.5	100.0%	-	-
Vancomycin	1.5	3	0.25-3	100.0%	-	-
Tetracycline	0.38	24	0.125-32	83.3%	-	16.7%
Ciprofloxacin	1.5	4	0.38-4	50.0%	50.0%	-
Chloramphenicol	6	8	3-12	83.3%	16.7%	-
Benzympenicillin	1	2	0.75-3	100.0%	-	-
Amoxicillin- Clavulanic Acid	0.5	1	0.25-1	100.0%	-	-
Doxycycline	0.22	12	0.094-16	83.3%	8.3%	8.3%
Erythromycin	2	16	1-16	-	75.0%	25.0%
Azithromycin	12	>256	3->256	-	33.3%	66.7%

* S = susceptible; I = intermediate; R = resistant.

CAPÍTULO 2

Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation

ABSTRACT

This clinical study was conducted to quantify cultivable bacteria and endotoxin in root canals with post-treatment apical periodontitis (PTAP) correlating their levels with the presence of clinical features; and also to evaluate the effect of chemo-mechanical preparation with 2% chlorhexidine-gel + 17% EDTA on bacterial and endotoxin removal/elimination. Moreover, the presence of target strict Gram-negative anaerobic bacteria was investigated by PCR. Fifteen root-filled teeth with PTAP were sampled before (s1) and after (s2) chemo-mechanical preparation using paper points. Culture techniques were used to determine the colony-forming unit. PCR technique (16S rDNA) was used for the detection of the target Gram-negative anaerobic bacteria. Turbidimetric assay was used to quantify endotoxins. *Prevotella nigrescens* (4/15), *Prevotella intermedia* (2/15) and *Tannerella forsythia* (2/15) were the most frequently target detected species. Endotoxin was detected in 100% of the root canal samples at s1 and s2. At s1, bacteria and endotoxin were detected in a median value of 5.14×10^3 CFU/mL and 3.96 EU/mL, respectively. A positive correlation was found between endotoxin and radiolucent area (>5 mm) ($p < 0.05$). Chemo-mechanical preparation was more effective in reducing bacteria in 99.61% than endotoxin in 60.6% (both $p < 0.05$) from root canal infection. Our findings indicated that the levels of endotoxin found in infected root canals were related to a larger size of radiolucent area in the periapical region. Moreover, chemo-mechanical preparation with 2% chlorhexidine-gel + 17% EDTA was effective in reducing both bacterial load and endotoxin contents in the post-treatment apical periodontitis.

Keywords: endotoxin; bacteria; endodontic infection; root canal preparation; endodontic failure.

INTRODUCTION

Bacteria and their by-products play a primary etiologic role in the development and perpetuation of apical periodontitis [1]. Post-treatment apical periodontitis (persistent or emerged apical periodontitis after root canal therapy) is microbiologically characterized as polymicrobial infection with participation of both Gram-positive [2-5] and -negative bacteria [6-9]. Among the Gram-negative anaerobic bacteria, species belonging to *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema* spp. are the most commonly detected [6-9]. These species possess lipopolysaccharide (LPS) on the outer layers of their cells walls, functioning as an endotoxin in the host organism [10].

LPS, generally referred as endotoxin, is an important virulent factors participating in the development of periapical inflammation and bone resorption [11-18]. When secreted in vesicles by growing organisms and/or released during disintegrations of bacteria after death [19] in the root canal, it can egress the apical foramen into the apex [20], initiating an inflammatory response in periapical tissues, know as an apical periodontitis. If endotoxin is not neutralized or eliminated by root canal therapy, its capable to perpetuate such inflammatory process, and possibly contribute the development of clinical symptomatology [10, 15-16, 18, 21].

Therefore, the main goal of an endodontic treatment is based not only bacterial load reduction, but also on the elimination of endotoxin from infected root canals, which are important for the healing process of the inflammatory process present in periapical tissues [16-17]. Over the years, special attempt has been given to evaluate the efficacy of chemo-mechanical preparation on bacterial and endotoxin reduction/elimination from primarily infected root canals [16, 17, 22-23]. However, most studies had focused on endotoxin from primarily infection [10, 16-17, 21-23] and little is known about its participation in post-treatment apical periodontitis [18].

This clinical study was conducted to quantify cultivable bacteria and endotoxin in root canals with post-treatment apical periodontitis correlating their levels with the presence of clinical features, and to evaluate the effect of chemo-mechanical preparation with 2% chlorhexidine-gel (CHX-gel) on the bacterial and endotoxin removal/elimination. The presence of target Gram-negative bacteria was also investigated by PCR.

MATERIALS AND METHODS

Patient selection

Fifteen patients were selected from those who attended the Piracicaba Dental School, SP, Brazil, needing nonsurgical endodontic retreatment due to persistent or emergent apical periodontitis. Fifteen teeth were included. All of them had been previously root filled and showed radiographic evidence of apical periodontitis. A detailed medical and dental history was obtained from each patient. None of the patients analyzed presented periodontal disease. Failure of root canal treatment was determined on the basis of clinical and radiographic examinations. Presence of persistent periapical radiolucent lesion, voids in or around the root canal filling, persistent symptoms such as pain of palpation, discomfort to percussion, persistent sinus were considered reasons for retreatment [5].

The following features were recorded for each patient, so that they could be correlated with the microbial and endotoxin findings: tooth type, time after endodontic treatment, previous episode of pain, clinical signs (including tenderness to percussion, pain on palpation), presence or absence of a sound coronal restoration, caries, sinus, radiographic quality of the root canal filling and the size of the periapical radiolucency.

Teeth were examined at x16 magnification under an operating microscope (Opto, São Carlos, SP, Brazil) to analyze the margin for the coronal restoration and tooth structure. Coronal restorations were categorized as defective if there had open margins, fracture or recurrent decay. Teeth showing restorations involving the gingival third was an exclusion criterion in the present study. Initial root fillings were classified as good if no voids were present and were within 2 mm of the radiographic apex. If one or more of these criteria were not met, they were classified as poor [24].

Samples were collected from 15 single rooted teeth with single canals. Their pulp chamber was without visual communication to the oral fluid and absence of periodontal disease. Teeth that could not be isolated with rubber dam were excluded. Patients who had received antibiotic treatment during the last 3 months and previously root canal treatment performed in less than 2 years were excluded from the study. The Human Volunteers Research and Ethics Committee of the Dental School approved a protocol

describing the specimen collection for this investigation, and all patients signed an informed consent document to participate in the study.

Sampling procedures

All materials, including the paper points used in this study, were heat sterilized at 250°C for 30 minutes, becoming free of endotoxin and sterilized.

The methods followed for the microbiologic procedures performed in this study have been previously described [14, 17]. The teeth were isolated from the oral cavity with a rubber dam, and the disinfection of their external surfaces and the surrounding field was carried out by using 30% hydrogen peroxide followed by 2.5% NaOCl. The solutions were inactivated with 5% sodium thiosulfate to avoid interference with bacteriologic sampling. The sterility of the external surfaces of the crown was checked by taking a swab sample from the crown surface and streaking it on blood agar plates, which was incubated aerobically and anaerobically.

The microbiological procedures used in this study had been previously described by Martinho & Gomes (2008) [16]. A 2-stage access preparation was performed. The access cavity was made without the use of water spray but under manual irrigation with sterile/ endotoxin-free saline and by using sterile/ endotoxin-free high-speed diamond bur. This first stage was performed to promote a major removal of the contaminants (microorganisms and endotoxins). In the second stage before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected following the decontamination protocol described above. Its sterility was checked by taking swab samples of the cavity surface and streaking on to blood agar plates, with subsequent incubation at 37°C under both aerobic and anaerobic conditions. A new sterile pyrogen-free bur was used, accomplished by irrigation with sterile/ endotoxin-free saline, to access the canal. Root-filling materials were removed by rotary instrumentation [Gates-glidden drills #5, 4, 3, 2 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and Hero-file #20.06 (MicroMega, Besançon, France)] and K-files in a crown-down technique without the use of chemical solvent, accomplished by irrigation with sterile/ endotoxin-free solution. A sterile pyrogen-free paper point (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) was then introduced into the full length of the canal and retained

in position during 60 seconds for sampling. The procedure was repeated with 5 paper points. Afterwards, first paper point was placed in a pyrogen-free glass for the Limulus Amebocyte Lysate (LAL), and the other paper points were pooled in a sterile tube containing 1 mL of VMGA III [25] transport medium for microbial cultivation. The transport medium samples were transported within 15 minutes to the anaerobic workstation (DonWhitley Scientific, Bradford, UK) for culture analysis. The endotoxin samples were frozen at - 20 °C for future analysis.

After accessing the pulp chamber and subsequently endotoxin and microbiological sampling (s1), the pulp chamber was thoroughly cleaned with 2% CHX-gel. The 2% CHX-gel (Endogel; Itapetininga, SP, Brazil) consisted of a gel base (1% natrosol) and CHX gluconate at pH 7.0. Afterwards, the best adjusted K-file (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) to root canal walls was placed into the full length of the root canal, confirmed by the apex locator (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel). The apical preparation was performed by using K-files ranging from size #45–80, followed by a step-back instrumentation, which ended after the use of 4 files larger than the last file used for the apical preparation. Root canals were irrigated with a syringe (27-gauge needle) containing 1 mL of the substance before the use of each instrument and immediately rinsed afterwards with 5 mL of saline solution. After the instrumentation, CHX antimicrobial activity was inactivated with 5 mL of a solution [5% Tween 80 and 0.07% (w/v) lecithin] during 1-minute period, which was flushed out with 5 mL sterile/endotoxin-free saline solution [17]. Before the second sampling (s2), a continuous rinse with 5 mL of 17% EDTA solution for 3 minutes followed by a final rinse with 5 mL sterile/endotoxin-free saline solution was performed. Next, a second endotoxin and microbiological sample was taken (s2) as previously described.

Culture procedure

The culture procedure used for CFU counting in the present study had been previously published by Jacinto *et al.* (2005) [15] and Martinho & Gomes (2008) [16], allowing the recovery of both facultative as well as possibly slow-growing anaerobic microorganisms present in the clinical samples after 14 days. The tubes holding the

transport medium samples were shaken thoroughly in a mixer inside an anaerobic chamber for 60 seconds. Serial 10-fold dilutions were made up to 10^{-4} in tubes containing Fastidious Anaerobe Broth (FAB, LAB M, Bury, UK). Fifty microlitres of each serial dilution were plated, by using sterile plastic spreaders, onto 5% defibrinated sheep blood fastidious anaerobe agar (FAA; LAB M, Bury, UK) to nonselectively culture obligate anaerobes and facultative anaerobes. The plates were incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂ for up to 14 days. After this period, the colony-forming units (CFUs) were visually quantified for each plate.

Bacterial Detection (Polymerase chain reaction - PCR 16S rDNA)

Reference bacteria strains used in this study were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and are listed as follows: *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33099), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037), *Prevotella tannerae* (ATCC 51259), *Treponema denticola* (ATCC 35405) and *Treponema socranskii* (ATCC 35536).

DNA Extraction

Microbial DNA from initial endodontic samples as well as from ATCC bacteria were extracted and purified with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration (absorbance at 260 nm) was determined using a spectrophotometer (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE).

PCR Assay

The PCR reaction was performed in a thermocycler (My-Cycler; Bio-Rad, Hercules, CA) thermocycler in a total volume of 25 µL containing 2.5 µL of 10X Taq buffer (1x) (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 0.5 µL of dNTP mix (25 µmol/L of each deoxyribonucleoside triphosphate—dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) (MBI Fermentas,

Hanover, MD), 1.25 μ L of 25 mmol/L $MgCl_2$, 0.25 μ L of forward and reversal universal primers (0.2 μ M) (Invitrogen, Eugene, OR), 1.5 μ L of sample DNA (1 μ g/50 μ L), 1.5 μ L of Taq DNA polymerase (1 U) (MBI Fermentas), and 17.25 μ L of nuclease-free water. The primer sequences and PCR cycling parameters were previously optimized [14] and listed in Table 1.

Determination of endotoxin concentration

All glassware used in the determination of endotoxin were heat sterilize at 250°C for 30 minutes. The turbidimetric test (Pyrogen 5000 - BioWhitaker, Inc., Walkersville, MD, USA) was used to measure endotoxin concentrations in the root canals by means of the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) technique. It is a kinetic, quantitative assay for the detection of endotoxin. Activated LAL converts the coagulogen to coagulagin to form turbidity in the sample. The increase in optical density is measured as a reaction time and it is inversely correlated with the level of endotoxin found in the sample.

First, as a parameter for calculation of the amount of endotoxin in root canal samples, a standard curve was plotted using the endotoxin supplied by the kit with a known concentration (100 EU/mL), and its dilutions reaching the following final concentrations (i.e. 0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions.

To avoid inhibition or enhancement of the LAL, a known concentration of *Escherichia coli* endotoxin was added to the clinical samples, as recommended by the manufacturer' instructions (spike procedure). The unspiked samples together with the spiked samples (control) had their endotoxin concentration automatically calculated. The endotoxin recovered were equal to the known concentration of the spike within 50% to 200%.

Test Procedure

Initially, no serial dilution of the clinical samples was considered. Thereafter, if the tested samples were found to be inhibitory to the turbidimetric LAL reaction, serial dilutions of the root canal samples were made. All reactions were accomplished in

duplicate to validate the test. A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) was used in a heating block at 37°C and maintained at this temperature throughout the assay. First, the endotoxin-samplings were suspended in 1 mL of LAL water supplied by the kit and agitated by vortexing for 60 seconds. Immediately, 100 µL of the blank, followed by the same volume of the standard endotoxin solutions (i.e. 0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) and 100 µL of the samples were added in duplicate to the 96-well microplate, with their respectively positive controls. The test procedure was performed following the manufacturer's instructions. The absorbance of endotoxins was individually measured using an enzyme-linked immunosorbent assay plate-reader (Ultramark, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The microplate reader/WinKQCL Software (BioWittaker, Cambrex Co., Walkersville, MD, USA) monitors the absorbance at 340 nm of each well of the microplate continuously throughout the assay. Using the initial absorbance reading of each well as its own blank, the reader determines the time required for the absorbance to increase 0.03 absorbance units. This time is termed ReactionTime. The WinKQCL Software automatically performs a log/log linear correlation of the Reaction Time of each standard with its corresponding endotoxin concentration. The standard curve parameters are printed on the report printout. If the absolute value of the correlation coefficient (r) is 0.980, a polynomial model can be used to construct a standard curve and in turn predict endotoxin concentrations of test samples. This polynomial curve-fitting model (POWERCURVE) requires the use of the WinKQCL Software.

Statistical analysis

The results obtained with the LAL test were statistically analyzed using SPSS for WINDOWS, version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Moreover, the data collected [colony-forming unit (CFU) counts and endotoxin concentrations] were statistically analyzed. The Friedman test was performed to compare the amount of bacteria and endotoxin before (s1) and after chemo-mechanical preparation (s2). When significant differences were found between different sampling times, the Wilcoxon test was used subsequently. The Pearson chi-square test or the one-sided Fisher exact test as appropriate was chosen to test the null hypothesis that there was no relationship between bacteria or

endotoxin and the presence of specific endodontic features. Significance levels were always set at 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

No microbial growth and bacterial DNA was observed in any of the sterility check samples. Bacterial DNA was detected in all initial root canal samples (15/15). *Prevotella nigrescens* (4/15), *Prevotella intermedia* (2/15) and *Tannerella forsythia* (2/15) were the most frequently detected Gram-negative anaerobic bacterial species (Table 2).

The following clinical and radiographic features of the fifteen single-rooted teeth involved in this study were detailed in Table 2: TTP (n=6), POP (n=7), root canal filling quality: good and poor (n=4 and 11, respectively), distance from apex ≤ 2 mm and > 2 mm (n=11 and 4), size apical periodontitis – ≤ 5 mm and > 5 mm (n=9 and 6, respectively) and date of previous treatment < 10 years and ≥ 10 years (n=7 and 8, respectively). None of the patients analyzed presented periodontal disease. All coronal restoration of resin composite presented defective with open margins when examined at operating microscope.

At the baseline samples, cultivable bacteria were detected in 100% of the root canal samples with a median value of 5.14×10^3 CFU/mL (ranging from 20 - 1.7×10^5 CFU/mL) (Table 3). In samples from asymptomatic teeth, the median value was 2.99×10^3 CFU/mL (6/15), whereas in symptomatic teeth (i.e. with POP and/or TTP) it was 8.34×10^3 CFU/mL (9/15).

The Turbidimetric Kinetic LAL-assay indicated that endotoxins were present in 100% of the root canal samples before (s1) and after (s2) chemo-mechanical preparation. At the baseline samples (s1), the median level of endotoxin found in root canal infection was 3.96 EU/mL, ranging from 0.0823 to 15.3 EU/mL (Table 3). A positive correlation was found between higher levels of endotoxin and larger area of bone destruction (radiographic lesion > 5 mm) ($r_{\text{pearson}} = 0.041$) (Table 3). Higher levels of endotoxin and CFU values were found in teeth root-filled for a longer period (≥ 10 years) – 9.44×10^3 CFU/mL and 3.96 EU/mL than in recently obturation (< 10 years) – 5.14×10^3 CFU/mL and 2.28 EU/mL respectively (Table 4). Teeth showing radiographically poor endodontic treatment harbored higher CFU values (8.34×10^3 CFU/mL) and endotoxin contents (4.29 EU/mL) than in

good quality root filling, 3.3×10^2 CFU/mL and 1.47 EU/mL respectively (Table 3). In addition, the distance of root filling from the apex, was also a critical factor for bacterial and endotoxin levels found in root canal infection: within 2 mm (8.4×10^2 CFU/mL and 3.96 EU/mL) and greater than 2 mm from the apex (9.72×10^3 CFU/mL and 5.74 EU/mL), respectively (Table 4).

After chemo-mechanical preparation (s2), the bacterial load dropped to a median percentage value of 99.61 ($p < 0.05$), whereas endotoxin contents were reduced to a median percentage value of 60.6 ($p < 0.05$). Analyses of the quantitative data revealed that the level of endotoxin at s2 was significantly reduced in comparison with s1 (Wilcoxon test $p < 0.05$).

DISCUSSION

The Turbidimetric Kinetic LAL-assay was chosen to quantify endotoxin levels in post-treatment apical peridontitis because of its extreme sensitivity for the detection of minute quantities of endotoxin. Culture, rather than contemporary techniques (molecular methods) [6-9, 26-27], is a widely used method to evaluate the antimicrobial efficacy of root canal procedures against viable bacteria in root canal infection [23, 28]. Correlations between absence bacteria and a favorable treatment outcome have been reported [29-31].

All root canals evaluated in this study presented a defective quality of coronal restoration confirming the importance of coronal restoration to the successful endodontic outcome [24, 32-33].

In the present study, the initial number of viable bacteria in post-treatment apical peridontitis ranged from 20 to 1.7×10^5 CFU/mL. Corroborating, typical investigation [34] showed CFU values ranging from 0 - 2.3×10^5 CFU/mL. Conversely, Peciuliene *et al.* [35] demonstrated higher contents of CFU values ranging from 40 to 7×10^7 . It should be pointed out that differences in CFU counts among these clinical studies might be related to case selection. Particularly, higher median CFU count was found in teeth with the presence of any type of clinical symptomatology – tenderness to percussion (TTP) (median: 6.41×10^3 CFU/mL) as well as pain on palpation (POP) (median: 9.44×10^3 CFU/mL) than in its absence (TTP: 5.14×10^3 CFU/mL and POP: 2.66×10^3 CFU/mL). Such

finding indicates that bacterial load present in root canal infection is directly related to inflammatory process taking place in periapical area [2].

At initial samples (s1) data obtained in the present study, indicated the presence of bacterial DNA by universal primer in all initial root canal samples. Particularly, target Gram-negative bacterial species was detected by PCR in 5/15 root canals investigated. Among the Gram-negative bacterial species investigated, *P. nigrescens* was the most frequent detected. Martinho *et al.* [14] reported that the high frequency of *P. nigrescens* in teeth showing apical periodontitis might to be related to its LPS potential in causing bone resorption.

The Turbidimetric Kinetic LAL-assay indicated the concentration of endotoxin in all root canal samplings in a median value of 3.96 EU/mL, which is lower when compared to primary infection (median value: 9.19 EU/mL) [14, 36]. Horiba *et al.* [18] investigating endotoxins in teeth with post-treatment apical periodontitis revealed a median value of endotoxin of 5.9 µg/mL, determined by the gel-clot method (semi-quantitative test). For instance, it is not possible to reconcile such levels of endotoxin because of the different methods used, which is determinant for this type of comparison [36].

At the baseline samples (s1), target Gram-negative bacterial species was detected in 5/15 root canals investigated whereas endotoxin was recovered from all 15 teeth. Such result possibly indicates that the endotoxins detected in these root canals can be either from the presence of others Gram-negative bacterial not investigated by the present study, which can be possibly found in endodontic infection; or even by the selected species but with present in a low DNA concentration, underestimated by the PCR 16S rDNA sensitivity. It is worth to point out that the selection criteria for the investigation of *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia*, *Prevotella tannerae*, *T. denticola* and *T. socranskii* used in the present study were based on the frequent occurrence of these species in endodontic infections [6-9].

Higher levels of endotoxin were found in teeth with apical periodontitis presenting longer date of endodontic treatment (≥ 10 years) (3.96 EU/mL) than < 10 years (2.28 EU/mL). Such finding can be explained possibly by an inefficient primarily disinfection, which can leave behind living Gram-negative bacterial cells in the apical third, that can maintain the LPS in higher levels. Furthermore, after approximately 5 years [37],

the loss in the mass of the Gutta-percha can result in empty space inside the root canal system that favorable the bacterial re-colonization; carrying selected bacterial species which metabolic products contribute for the degradation of the polyisoprene rubbers [37].

Teeth showing radiographic poor endodontic pretreatment - with root canal filling greater than 2 mm from the apex and/or poor gutta-percha compaction - tended to harbor not only a greater number of bacteria (9.72×10^3 CFU/mL and 8.34×10^3 CFU/mL) but also higher levels of endotoxin (5.74 EU/mL and 4.29 EU/mL). Particularly, root canal partially cleaned, shaped and filled, leaves behind non-instrumented areas which function as reservoirs of infection [38], rendering a microbiota similar to that of primary infection with predominance of Gram-negative bacteria [6-9, 14].

In the present study mostly teeth presenting a distance of root filling > 2 mm from the apex presented tenderness to percussion and/or pain on palpation. Higher contents of endotoxin have been associated with the presence of clinical symptomatology [10, 15-16, 18].

With respect the size of radiolucent area, our findings indicated that, in contrast to a relative lower CFU count found in teeth with radiographic lesion < 5 mm, a positive correlation was found between higher levels of endotoxin and larger area of bone destruction (> 5 mm), in accordance to previous studies [14, 18]. Taking into account that post-treatment apical periodontitis is a polymicrobial infection [2-5, 35, 38], such finding suggests that Gram-negative bacterial LPS rather than Gram-positive bacterial cell - also accounted in the CFU counts reported in the present study - has to do with bone-resorption [11-18]. It has long been known that bacterial LPS are potent stimuli for proinflammatory cytokines production – i.e. interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) - by different cells present in periapical tissues trough TLR4-activation (Toll-like receptor 4) [39-40]. Martinho *et al.* [14] demonstrated that higher level of endotoxins was followed by the increased production of IL-1 β in teeth with larger area of bone resorption.

Regarding the levels of endotoxin found in teeth with clinical symptomatology, in contrast to the CFU counts, a relatively more pronounced content of endotoxin was found in asymptomatic teeth than those with TTP or POP; however, it was not significant. Taken into account the wide range of endotoxins concentration found in the 15 root canals analyzed, limited information could be drawn with such finding. However, Horiba *et al.*

[18] found a correlation between higher levels of endotoxin and the presence of clinical symptomatology using a semi-quantitative LAL test. Future studies must be performed in order to support such findings.

In contrast to the bacterial load reduction (in $\approx 99.61\%$), chemo-mechanical preparation with 2% CHX-gel followed by the use of 17% EDTA was able to reduce LPS content in only 60.6%. It is reasonable to assume that the limited LPS disinfection is not due only to the lack of the detoxifying activity of the auxiliary chemical substance used [17] but also to the limited effectiveness of the hand instrumentation in removing root-filling materials from dentin walls.

Whether the residual amount of LPS found in root canal after chemo-mechanical preparation with 2% CHX-gel is capable or not to cause damage effects to periapical tissues contributing to the perpetuation of clinical symptoms and maintenance of the apical peridontitis is still unknown. Perhaps, the placement of an intracanal medication with endotoxin-detoxifying activity, indicated for teeth with exudation, might be a good strategy against LPS [41-42].

Overall, the time after endodontic treatment together with the primary disinfection efficiency of the root canal systems, the coronal restoration and the root canal filling quality, regarding the distance of the root filling from the apex as well as the gutta-percha compaction, were critical points involved in the recovery of endotoxin from post-treatment apical periodontitis.

Our findings indicated that chemo-mechanical preparation with 2% chlorhexidine-gel + 17% EDTA was effective in the reduction of bacterial load and endotoxin contents from post-treatment apical periodontitis. Moreover, the levels of endotoxin found in infected root canals were related to larger size radiolucent area in periapical region.

REFERENCES

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) Effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20:340–9.

2. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:86-93.
3. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31:1-7.
4. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M (2000) Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 26:593-5.
5. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003) Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36:1-11.
6. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C (2005) Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* 20:289-95.
7. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 20:211-5.
8. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Souza ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ (2006) Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod* 32:937-40.
9. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira Jr JF (2008) Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 34:926-31.
10. Schein B, Schilder H (1975) Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1:19-21.
11. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD (1987) Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res* 2:559-65.

12. Artese L, Piattelli A, Quaranta M, Colasante A, Musani P (1991) Immunoreactivity for interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 17:483-7.
13. Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H (1992) Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod* 18:497-500.
14. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA (2010) Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *J Endod* 36:1467-74.
15. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2005) Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 54:777–83.
16. Martinho FC, Gomes BPFA (2008) Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemo-mechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 34:268-72.
17. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME (2009) Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 35:1350-3.
18. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H (1991) Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71:492-5.
19. Nair PNR (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Med* 15:348–81.
20. Pitts DL, Williams BL, Morton TH (1982) Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod* 8:10–8.
21. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJR (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 90:200-6.
22. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE (2001) Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod* 27:325–7.
23. Machado MEL, Sapia LAB, Cai S, Martins GHR, Nabeshima CK (2010)

Comparison of two rotary systems in root canal preparation regarding disinfection. *J Endod* 36:1238-40.

24. Ray HA, Trope M (1995) Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 28:12-8.

25. Möller AJR (1966) Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 74:1–380.

26. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A (2006) Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 32:173-7.

27. Subramanian K, Mickel AK (2009) Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 35:950-7.

28. Brito PRR, Souza LC, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, De-Deus G, Lopes HP, Siqueira Jr JF (2009) Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. *J Endod* 35:1422-7.

29. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297-306.

30. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005) Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 31:863-6.

31. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Riche FNSJ, Provenzano JC (2008) Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106:757-62.

32. Lazarski MP, Walker III WA, Flores CM, Schindler WG, Hargreaves KM (2001) Epidemiological evaluation of the outcomes of nonsurgical root canal treatment in a large cohort of insured dental patients. *J Endod* 27:791-6.

33. Schwartz RS, Fransman R (2005) Adhesive dentistry and endodontics: materials, clinical strategies and procedures for restoration of access cavities: a review. *J Endod* 31:151-65.

34. Cheung GSP, Ho MWM (2001) Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 16:332-7.

35. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 34:429-34.
36. Martinho FC, Chiesa WMM, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA (2011) Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 37:163-7.
37. Maniglia-Ferreira C, Silva Jr JBA, Paula RCM, Feitosa JPA, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ (2007) Degradation of trans-polyisoprene over time following the analysis of root fillings removed during conventional retreatment. *Int Endod J* 40:25-30.
38. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001) Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:579-86.
39. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H, Ozeki M (1989) Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. *J Endod* 15:530-4.
40. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS (2004) The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 33:162-9.
41. Safavi KE, Nichols FC (1994) Alteration of biologic properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod* 20:127-9.
42. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB (2003) Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 36:733-9.

Table 1. PCR primer pairs and cycling parameters used for detection of bacteria species in post-treatment apical periodontitis.

Target bacteria	Primer pairs (5'-3')	Amplicon size	Cycles
Universal (16S rDNA)	Forward: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T Reverse: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466 bp	Initial denaturation at 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and a final extension step at 72°C for 25 s
<i>Prevotella intermedia</i>	Forward: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG Reverse: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Prevotella nigrescens</i>	Forward: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG Reverse: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Tannerella forsythia</i>	Forward: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA Reverse: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641 bp	Initial denaturation at 95°C for 1 min and 36 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step 72°C for 2 min
<i>Prevotella tannerae</i>	Forward: CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG Reverse: CAG CTG ACT TAT ACT CCC G	550 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Treponema denticola</i>	Forward: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse: TCAAAGAAGCAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min
<i>Treponema socranskii</i>	Forward: GAT CAC TGTATA CGGAAGGTAGACA Reverse: TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	288 bp	Initial denaturation at 95°C for 2 min and 36 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step 72°C for 10 min

Table 2. Clinical features and the presence of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tannerae*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and *Treponema socranskii* in post-treatment apical periodontitis.

Patients	Age	Tooth	TTP	POP	Time after treatment	Endodontic filling	Size of lesion	Distance from apex	Species Gram-negative PCR (s1)
1	44	21	+	+	2	Good	9 mm	2 mm	-
2	45	12	-	-	>30	Poor	13 mm	1.5 mm	-
3	45	11	-	+	>10	Poor	14 mm	1.5 mm	-
4	19	11	+	-	6	Poor	2 mm	0	-
5	43	15	+	+	3	Good	5 mm	1 mm	-
6	44	45	+	-	>10	Good	8 mm	1mm	-
7	65	23	-	-	2	Poor	9 mm	0	<i>Prevotella nigrescens</i>
8	51	21	-	-	10	Poor	2 mm	2.5 mm	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Prevotella tannerae</i> <i>Treponema denticola</i>
9	38	22	-	+	15	Poor	10 mm	2.5 mm	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Tannerella forsythia</i>
10	51	11	-	-	10	Good	3 mm	1 mm	<i>Prevotella nigrescens</i> <i>Tannerella forsythia</i>
11	40	12	+	+	6	Poor	5 mm	2.5 mm	<i>Treponema socranskii</i>
12	32	22	+	+	20	Poor	5 mm	0	-
13	41	12	-	-	2	Poor	3 mm	0	-
14	53	22	-	+	20	Poor	5 mm	2.5 mm	-
15	43	43	-	-	7	Poor	3 mm	2 mm	-

TTP: Tenderness to percussion; POP: pain of palpation, +: positive detection, -: negative detection, s1: initial sample.

Table 3. Bacteria (CFU values) and endotoxin found in 15 root canals with post-treatment apical periodontitis regarding the presence of clinical symptomatology and size of periapical radiolucency.

	All teeth S1	All teeth S2	Clinical symptomatology				Periapical radiolucency	
			TTP		POP			
	<i>n</i> =15	<i>n</i> =15	Presence (<i>n</i> =6)	Absence (<i>n</i> =9)	Presence (<i>n</i> =7)	Absence (<i>n</i> =8)	≤5 mm (<i>n</i> =9)	>5 mm (<i>n</i> =6)
Bacteria (CFU/mL)								
Median value	5.14x10 ³	20	6.41x10 ³	5.14x10 ³	9.44x10 ³	2.66x10 ³	8.34x10 ³	2.74x10 ³
Ranging values	(20 – 1.7x10 ⁵)	(0 – 1.96x10 ³)	(20 – 1.54x10 ⁵)	(2.8x10 ² – 1.7x10 ⁵)	(20 – 1.6x10 ⁵)	(2.6x10 ² – 1.7x10 ⁵)	(20 – 1.7x10 ⁵)	(2.6x10 ² – 1.6x10 ⁵)
Endotoxin (EU/mL)								
Median value	3.96	1.34	3.26	3.96	2.23	4.735	2.28*	4.735*
Ranging values	(0.0823 – 15.3)	(0 – 8.62)	(0.729 – 15.3)	(0.0823 – 14.5)	(0.0823 – 15.3)	(0.447 – 14.5)	(0.0823 – 15.3)	(0.729 -14.5)

CFU, colony forming units; TTP, tenderness to percussion; POP, pain on palpation.

*Statistical significance difference (p<0.05)

Table 4. Bacteria (CFU values) and endotoxin found in 15 root canals with post-treatment apical periodontitis regarding the distance of gutta-percha from the apex, time after treatment and quality of root canal filling.

	Distance of gutta-percha from the apex		Time after treatment		Quality of root canal filling	
	≤ 2 mm ($n=11$)	> 2 mm ($n=4$)	< 10 years ($n=7$)	≥ 10 years ($n=8$)	Good ($n=4$)	Poor ($n=11$)
Bacteria (CFU/mL)						
Median value	8.4×10^2	9.72×10^3	5.14×10^3	9.44×10^3	3.3×10^2	8.34×10^3
Ranging values	($20 - 1.7 \times 10^5$)	($8.34 \times 10^3 - 1.6 \times 10^5$)	($20 - 1.7 \times 10^5$)	($2.8 \times 10^2 - 1.6 \times 10^5$)	($20 - 1.54 \times 10^5$)	($2.8 \times 10^2 - 1.7 \times 10^5$)
Endotoxin (EU/mL)						
Median value	3.96	5.74	2.28	3.96	1.47	4.29
Ranging values	(0.447 – 14.5)	(0.0823 – 15.3)	(0.729 – 15.3)	(0.0823 – 9.27)	(0.447 – 5.51)	(0.0823 – 15.3)

CFU, colony forming units.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Justificativa da pesquisa

Na Endodontia, um entendimento detalhado sobre os microrganismos envolvidos na infecção dos canais radiculares é fundamental para obtenção do sucesso na terapia; visto que, bactérias e seus subprodutos desempenham um papel crucial na etiologia destas doenças (Kakehashi *et al.*, 1965; Takahashi, 1998; Gomes *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008a). Bactérias persistentes após o tratamento endodôntico que resistiram ao preparo e que se proliferaram no canal radicular, ou aquelas que contaminaram o canal após a obturação do canal radicular através das microinfiltrações coronárias, são os principais responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico (Cheung, 1996; Gomes *et al.*, 1996b; Siqueira, 2001).

A microbiota de dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical também foram estudados por vários autores (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira & Rôças, 2004; Endo, 2011).

Nos estudos anteriores relacionados à infecção endodôntica secundária, o gênero enterococos foi identificado em alta frequência. Os enterococos são bactérias entéricas, geralmente isoladas de seres humanos (Murray *et al.*, 1990). Estas bactérias comensais que colonizam naturalmente o trato gastrointestinal, também existem, ocasionalmente em outras partes anatômicas, incluindo a cavidade oral e o trato vaginal. Certos estudos relataram o problema destas bactérias como agentes patogênicos nosocomiais que, normalmente, apenas causam infecção quando a imunidade do hospedeiro se encontra comprometida. *Enterococcus faecalis* foi frequentemente encontrado em canais obturados e presença de lesão periapical. Este microrganismo facultativo Gram-positivo é capaz de resistir ao tratamento endodôntico, de penetrar nos túbulos dentinários e de

sobreviver a períodos extensos em ambientes nutricionais limitados (Rôças *et al.*, 2004; Sedgley *et al.*, 2005b). Além disso, *E. faecalis* tem importância na área médica, visto que está associado a infecções humanas como: bacteremias, endocardites, infecções urinárias, infecções no trato biliar e abscessos intra-abdominais (Murray, 1990; Murray, 1998). Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis* (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Os enterococos têm um crescente potencial como agentes causadores de sérias infecções embora pouco se saiba sobre sua virulência. Esta falta de informação pode ser atribuída ao fato destas bactérias, que vivem normalmente como comensais na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, possuírem traços de virulência muito sutis que não são facilmente identificados (Shankar *et al.*, 1999). A prevalência de *E. faecalis* nas infecções endodônticas secundárias (Gomes *et al.*, 2008a) ressalta a importância da discussão e conhecimento dos seus fatores de virulência e sua suscetibilidade antimicrobiana, pois determinam sua patogenicidade. A presença destes fatores, tornam as cepas capazes de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os fatores de virulência mais citados na literatura são a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipoteicóico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Essas capacidades de resistência e sobrevivência aos tratamentos endodônticos faz do *E. faecalis* objeto da presente pesquisa.

Infecções severas causadas por bactérias tem adquirido resistência aos agentes antimicrobianos (Owens, 2008; Hawkey, 2008). Na Endodontia, o papel da terapia antibiótica sistêmica é limitado. Normalmente, é aplicada quando os pacientes apresentam edema difuso, febre, mal-estar e linfadenopatia. Antibióticos sistêmicos podem também ser utilizados durante uma profilaxia antibiótica para pacientes clinicamente comprometidos. Apesar de existirem diretrizes de tratamento, dentistas tendem a sobre-prescrever antibióticos em sua prática, muitas vezes sem razão suficiente para a escolha de um determinado fármaco (Öcek *et al.*, 2008; Rodriguez-Núñez *et al.*, 2009). A resistência da microbiota oral aos antibióticos aumentou durante esses anos, possivelmente devido à utilização empírica de antibióticos para uma diversidade de patologias (Al-Haroni, 2008; Monnet & Kristinsson, 2008). O uso de antibióticos e as taxas de resistência microbiana não são homogêneas em todo o mundo (Van Winkelhoff *et al.*, 2005; Monnet & Kristinsson, 2008). Assim, é prudente estudar as alterações na suscetibilidade

antimicrobiana de patógenos endodônticos para facilitar a escolha de um adequado antibiótico quando indicado para o tratamento de infecções.

Embora infecções crônicas em dentes com tratamento endodôntico prévio não necessitem de antibioticoterapia, pacientes com endocardite requerem profilaxia antibiótica durante o retratamento endodôntico (Abbott *et al.*, 1990). É importante destacar que existem trabalhos na literatura que mostraram resistência de cepas de *Enterococcus* spp. frente a alguns antibióticos, especialmente ao antibiótico penicilina (Matsuo, 1981; Dahlén *et al.*, 2000), eritromicina (Pinheiro *et al.*, 2003a), azitromicina (Nord & Wordström, 1973; Stern *et al.*, 1990; Rams *et al.*, 1992; Pinheiro *et al.*, 2003a), benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol, tetraciclina (Dahlén *et al.*, 2000), cloranfenicol e a vancomicina (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Mundy *et al.*, 2000, Shepard & Gilmore, 2002). Testes periódicos de suscetibilidade antimicrobiana são necessários para uma adequada orientação sobre as terapias empíricas e destacar o problema da resistência antimicrobiana (Chan & Chan, 2003; Hawkey, 2008; Gomes *et al.*, 2011). Portanto, muitos antibióticos, geralmente utilizados em infecções endodônticas, podem mostrar-se ineficazes contra *E. faecalis*; deste modo informações sobre drogas alternativas são exigidas.

Fatores de virulência são definidos como substâncias produzidas pelos microrganismos que podem causar dano ao hospedeiro, por exemplo: toxinas bacterianas. O termo passou a significar qualquer componente do microrganismo que seja exigido para provocar doença ou potencializar sua capacidade para isso (Schaechter *et al.*, 1999). Foram estudados alguns fatores de virulência do *E. faecalis*, por ser um importante patógeno endodôntico presente nas infecções endodônticas secundárias. Os fatores de virulência estudados foram: substância de agregação (*asa* e *asa373*), antígeno de endocardite (*efaA*), gelatinase (*gelE*), fatores de aderência (*esp* e *ace*), citolisina (*cylA*) e adesinas, que facilitam sua resistência a antibióticos, agressão e adesão aos tecidos. É importante destacar que cada um desses fatores pode estar associado a vários estágios de infecções endodônticas, bem como à inflamação periapical.

Técnicas microbiológicas moleculares aumentam a sensibilidade de detecção microbiana e, assim, permitem a identificação dos patógenos endodônticos com maior

precisão (Fouad *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2008a). Além da PCR tradicional também foi aplicada a técnica de nested PCR. A seleção dos *primers* para a detecção bacteriana foi realizada baseada na literatura. Apesar de utilizarmos, na maioria dos casos, oligonucleotídeos já descritos na literatura, os ciclos de termociclagem e as temperaturas foram padronizados no laboratório de Microbiologia Endodôntica da FOP-UNICAMP. Essa padronização foi considerada devido a pouca informação contida nos artigos científicos, pois pequenas diferenças de temperatura, quantidade de ciclos, proporções e quantidade de reagentes podem interferir nos resultados.

Verificou-se por meio de técnicas moleculares a presença de bactérias Gram-negativas de difícil cultivo nas infecções endodônticas secundárias (Gomes *et al.*, 2008a; Endo *et al.*, 2012). Essas bactérias são relatadas com maior frequência nas infecções endodônticas primárias. Na parte externa da membrana dessas bactérias Gram-negativas observa-se um componente hidrofóbico denominado endotoxina, ou seja, o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é liberado quando a membrana bacteriana é rompida, e representa uma das mais potentes moléculas que ativam o sistema imune. Ele pode ser liberado durante a multiplicação ou morte celular, causando efeitos biológicos, os quais levam à reação inflamatória e reabsorção óssea nas periodontites apicais (Leonardo *et al.*, 2004; Mohammadi, 2011).

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, influência da irrigação, medicação intracanal e sistêmica (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Tronstad *et al.*, 1990). O preparo químico-mecânico do canal radicular reduz significativamente os microrganismos predominantes na microbiota endodôntica primária (Byström & Sundqvist, 1981; Peters *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2007; Martinho *et al.*, 2008). Entretanto, microrganismos persistentes sobrevivem, não somente pela incapacidade do preparo químico-mecânico em removê-los das complexidades anatômicas, mas também porque alguns nutrientes capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos residuais irão, inevitavelmente, ali permanecer e tais microrganismos restabelecerão a contaminação do espaço pulpar (Gomes *et al.*, 1996b).

Desde 1998, a orientadora desta tese, Profa. Dra. Brenda P. F. A. Gomes lidera na área de Endodontia da FOP-ÚNICAMP o grupo de pesquisa intitulado “Microbiologia aplicada à Endodontia”. No ano de 1999 iniciaram os estudos *in vivo* com o objetivo de identificar e verificar a prevalência dos microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas secundárias.

Os trabalhos de Pinheiro *et al.* (2003b) e Delboni (2009) apenas caracterizaram a microbiota dos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica secundária após a remoção da guta-percha. Diferentemente destes estudos anteriores, o presente trabalho monitorou antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) a eficácia dos procedimentos clínicos na redução de microrganismos e endotoxinas.

Endo (2011) realizou o monitoramento microbiológico, identificando os microrganismos e quantificando as unidades formadoras de colônia (UFC) durante diferentes etapas do retratamento endodôntico. As coletas foram realizadas após a remoção da guta-percha (C1), após o preparo químico-mecânico (C2), após 5 dias com o canal preenchido com soro fisiológico (C3), após o re-preparo químico-mecânico (C4) e após o uso da medicação intracanal (C5). Foi observada uma maior redução de microrganismos logo após o preparo químico-mecânico (C2) e deve-se ressaltar que após 5 dias (C3) verificou-se um aumento de UFCs. É importante destacar também que o uso da medicação intracanal não potencializou a redução de microrganismos.

Atualmente, muito tem se falado sobre a etiologia e tratamento das infecções endodônticas primárias, entretanto não podemos esquecer os casos de dentes tratados endodonticamente, pois é um desafio ainda maior obter o sucesso destes casos. Diante do exposto, é importante enumerar alguns pontos do trabalho e verificar a relevância do presente estudo clínico:

1. Identificação do microrganismo mais prevalente nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (*Enterococcus faecalis*), por meio de técnicas tradicionais e avançadas.

2. Correlação dos aspectos clínicos e radiográficos e níveis de endotoxinas/microrganismos.

3. Conhecimento dos fatores de virulência que podem contribuir para a colonização de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares.

4. Avaliação da ocorrência de resistência do *Enterococcus faecalis* frente aos antibióticos mais frequentemente utilizados na Odontologia.

Material e métodos propostos

A execução da presente pesquisa intitulada “Investigação in vivo de microrganismos e endotoxinas nas infecções endodônticas secundárias antes e após o preparo químico-mecânico” foi iniciada após a aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Encontra-se no Anexo I o certificado de aprovação do comitê de ética em pesquisa.

No presente estudo, os pacientes indicados ao retratamento endodôntico foram triados após avaliação clínica e radiográfica. É importante destacar que o insucesso endodôntico é caracterizado com o aparecimento ou a persistência de uma infecção periapical. Pode ser detectado por exame radiográfico através da observação de rarefações ósseas periapicais, as quais permaneceram inalteradas, aumentaram ou somente diminuíram de tamanho ou surgiram após o tratamento endodôntico, ou através de sinais e/ou sintomas clínicos do dente tratado endodonticamente (Strindberg *et al.*, 1956). A preservação do tratamento endodôntico deve ter um acompanhamento clínico e radiográfico por um período de no mínimo 4 anos (Strindberg *et al.*, 1956; Engström *et al.*, 1964; Sjögren *et al.*, 1997). Os pacientes com doenças sistêmicas, história de antibioticoterapia inferior a 3 meses, doença periodontal, fratura radicular, impossibilidade de isolamento absoluto e

exposição da guta-percha ao meio bucal não foram incluídos neste estudo eliminando as possibilidades de interferência na real microbiota residente no canal radicular.

Por se tratar de um estudo clínico é relevante correlacionar os achados clínicos e radiográficos com os níveis de endotoxinas e unidades formadoras de colônias, assim como com os achados microbiológicos (cultura e PCR). Como observado no capítulo 2 deste exemplar foram anotadas informações clínicas relevantes como: idade do paciente, dente afetado, dor à percussão, dor à palpação, distância apical da guta-percha até o forame apical, tempo decorrido do tratamento endodôntico prévio até o retratamento, qualidade da obturação do canal radicular e tamanho da lesão periapical.

As amostras deste estudo foram coletadas de pacientes indicados ao retratamento endôntico que apresentavam tratamento endodôntico prévio e lesão periapical. Neste estudo foram coletadas amostras de 30 canais de dentes unirradiculares com infecção endodôntica secundária, caracterizando o insucesso endodôntico. Foram realizadas coletas para identificação microbiana e quantificação de endotoxinas. As coletas foram realizadas em dois momentos, após a remoção do material obturador (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2). Para a realização das coletas foram utilizados métodos assépticos. A técnica utilizada para realização das coletas microbiológicas foi descrita previamente em detalhes por Gomes *et al.* (1994a,b; 1996a,b; 2004, Pinheiro *et al.* 2003b), detalhada no Apêndice I e descrito nos capítulos anteriores deste exemplar. As coletas da superfície externa da coroa e da face interna da cavidade de acesso resultaram em cultura negativa, confirmando sua desinfecção pelo método de cultura e PCR 16S rDNA. Para evitar o risco de contaminação, a coleta das amostras de endotoxinas em C1 e C2 foi realizada previamente à coleta para análise microbiana. Tal coleta foi feita com um cone de papel, previamente esterilizado a 200°C, por 4 horas em estufa, tornando-o apirogênico, como recomendado pelo fabricante. O meio de transporte VMGA III (Viability Medium Göteborg Ágar) foi descrito inicialmente por Möller (1966) e Dahlén *et al.* (1993). Este meio é preparado para suportar tanto o crescimento de microrganismos anaeróbios estritos quanto os facultativos. É aplicado para amostras pequenas, coletadas com pontas de papel absorventes. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluída acima de 30°C (Apêndice II).

Todos os materiais utilizados durante a coleta e a execução do retratamento endodôntico apresentavam-se estéreis e apirogênicos para não interferir no resultado microbiológico e na quantificação de endotoxinas.

No presente estudo, para confirmar a limpeza das paredes do canal radicular após a remoção da guta-percha foi utilizado além da radiografia periapical, o microscópio operatório que também foi preconizado nos estudos de Schirrmeister *et al.* (2006) e Cunha *et al.* (2007).

O comprimento do dente foi obtido por meio do uso de um localizador foraminal (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel) pois esta ferramenta apresenta um elevado índice de sucesso e confiabilidade (Goldberg *et al.*, 2005). A utilização do localizador auxiliou na obtenção da patência e obtenção do comprimento real do dente, assegurando a realização da coleta e o preparo químico-mecânico em toda extensão do canal radicular.

A esterilidade da substância química auxiliar clorexidina 2% gel (CLX) e do soro fisiológico estéril/apirogênico usados no preparo químico-mecânico foi testada anteriormente para que não houvesse contaminação externa do canal radicular. Todos os testes microbiológicos das substâncias químicas auxiliares e soro fisiológico resultaram em culturas negativas indicando ausência de contaminação microbiológica. A clorexidina gel (Endogel; Itapetininga, SP, Brasil) utilizada no presente estudo consistiu de base gel (natrosol 1%) e digluconato de clorexidina 2% (pH 7,0). Optou-se pelo uso da clorexidina 2% gel por ter demonstrado biocompatibilidade aos tecidos periapicais, amplo espectro antimicrobiano e substantividade (Ferraz *et al.*, 2001).

Cultura microbiana e identificação bioquímica: nos capítulos 1 e 2 deste exemplar foi utilizada a metodologia de cultura microbiana.

Existem vários trabalhos na literatura que analisaram a microbiota do canal radicular de dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical (infecção secundária), utilizando, principalmente, técnicas de cultura e identificação bacteriana por meio de métodos bioquímicos tradicionais (Möller, 1966; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist

et al., 1998; Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b; Gomes *et al.*, 2004; Endo, 2011; Endo *et al.*, 2012).

A avaliação microbiológica desses canais consiste em remover o material obturador sem uso de solventes químicos e coleta com cones de papel absorventes estéreis e apirogênicos. Devido à dificuldade na coleta em canais obturados, é possível que muitos microrganismos não sejam isolados, particularmente quando estão em baixo número de células e quando são empregados métodos de cultura. Então, deve-se salientar que o não crescimento microbiano nesses casos, não significa ausência total de microrganismos.

Estudos avaliando a microbiota de canais não tratados endodonticamente e aqueles com intervenção endodôntica demonstram claramente pelo método de cultura que a qualidade e a quantidade dos microrganismos diferem marcadamente (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998, Endo, 2011). Em casos de infecção primária, a microbiota é mista, com predomínio de anaeróbios estritos, bacilos Gram-negativos, com cerca de 3-12 espécies/canal. Entretanto, em casos de infecção secundária, a microbiota está composta por um número limitado de espécies, particularmente bactérias Gram-positivas, podendo ser preferencialmente anaeróbias facultativas (Nair *et al.*, 1990; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003b; Endo, 2011). Estudos baseados em cultura microbiológica têm demonstrado uma infecção polimicrobiana (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003b; Endo, 2011). Bactérias facultativas e Gram-positivas mostram-se muito mais resistentes ao preparo do canal radicular e aos agentes antimicrobianos e, portanto é esperado que persistam após a terapia endodôntica. Bactérias facultativas são capazes de sobreviver em ambiente com restrição nutricional por longo período de tempo, com baixa atividade metabólica. A ocorrência de mudanças das condições nutricionais, como microinfiltração coronária, pode contribuir para o crescimento bacteriano (Molander *et al.*, 1998). De fato, estes microrganismos sobreviventes aos procedimentos de descontaminação do canal radicular desenvolvem respostas adaptativas frente às condições do novo ecossistema endodôntico (Gomes, 1996b).

Reação em cadeia da polimerase (16S rDNA): nos capítulos 1 e 2 deste exemplar foi utilizada a metodologia de PCR.

Inúmeros estudos que utilizaram a técnica de cultura para investigação de microrganismos em casos de infecção endodôntica secundária mostraram uma determinada porcentagem de culturas negativas. Nesses casos, um número de células bacterianas pode ser perdido durante os procedimentos de remoção do material obturador prévio. Consequentemente, o número de células coletadas pode estar abaixo do nível de detecção do método da cultura, e a prevalência dos microrganismos presentes nesses casos pode ser subestimada (Siqueira & Rôças, 2004). Para superar essas dificuldades inerentes ao método da cultura, pesquisadores têm utilizado métodos moleculares que são mais sensíveis, em especial a PCR (reação em cadeia da polimerase), para identificar bactérias dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio e conhecer a composição dessa microbiota permitindo a detecção de espécies bacterianas de difícil e/ou impossível cultivo (Rolph *et al.*, 2001; Siqueira & Rôças, 2004; Siqueira & Rôças, 2005a,b; Gomes *et al.*, 2007, 2008a,b; Endo *et al.*, 2012). Neste estudo observou-se maior sensibilidade técnica da PCR na detecção de *E. faecalis* quando comparado ao método de cultura microbiana (capítulo 1).

Além do *E. faecalis*, coco Gram-positivo frequentemente encontrado nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico, outros microrganismos Gram-negativos detectados em maior frequência nas infecções endodônticas primárias como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tannerae*, *Tanerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* também foram investigados nos casos de infecção endodôntica secundária. O presente estudo confirmou que esses microrganismos são encontrados em menores números tanto quanti- quanto qualitativamente (Blome *et al.*, 2008) quando comparado às infecções endodônticas primárias.

Nested PCR: no capítulo 1 deste exemplar foi utilizada a metodologia de nested PCR.

Esta técnica é uma variação da PCR, bastante sensível e específico, que envolve o uso de dois conjuntos de *primers* em reações distintas (Song, 2005; Siqueira & Rôças, 2005a; Singh *et al.*, 2006). A primeira reação de PCR emprega um conjunto de *primers* para amplificar o gene 16S rDNA dos patógenos a partir do DNA extraído de amostras

clínicas (Song, 2005). O produto desta reação é submetido a uma segunda reação de PCR que utiliza um *primer* de uma espécie específica, permitindo o seu anelamento a uma sequência compreendida no interior do primeiro amplicon (Singh *et al.*, 2006).

O nested PCR apresenta uma maior especificidade e sensibilidade quando comparado ao método de PCR convencional (Song, 2005). De fato essa afirmação pôde ser comprovada no capítulo 1. Este fato se deve ao maior número de ciclos aos quais as amostras são submetidas e também à restrição das sequências às quais os *primers* da segunda reação podem se anelar (Siqueira & Rôças, 2005a). Ocorre ainda a redução de inibidores de reação presentes na amostra inicial (Siqueira & Rôças, 2003). A maior desvantagem deste método é que durante a manipulação do produto da primeira reação há possibilidade de contaminação do local de trabalho com o DNA amplificado (Siqueira & Rôças, 2005a; Singh *et al.*, 2006).

Lisado Amebócito Limulus: no capítulo 2 desta tese foi utilizado o método LAL.

Limulus ameobocyte lysate (LAL), método de quantificação de endotoxinas utilizado no presente estudo, é o método mais sensível e específico disponível para a detecção e quantificação de endotoxina provenientes das bactérias Gram-negativas (Novitsky, 1985). O princípio do método baseia-se na reação entre a endotoxina e um componente protéico do lisado amebócito limulus (LAL).

Para realização do teste LAL Pyrogent-5000, todos os materiais que entraram em contato com a amostra ou reagentes do teste estavam apirogênicos (livre de endotoxinas). Os materiais clínicos e para coleta tornaram-se apirogênicos quando submetidos ao calor seco (estufa) a 200°C por um período de 4 horas.

O teste LAL Pyrogent-5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactérias Gram-negativas. Esse teste utiliza uma preparação de LAL, em combinação com um incubador fotométrico e um software apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma

aparência de turvação (densidade ótica). O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão (Endo, 2011).

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

Para maior confiabilidade dos resultados, o teste Pyrogen 5000 LAL é realizado em quadruplicata e apresenta o controle positivo do produto (PPC), o qual essa amostra é contaminada com uma quantidade conhecida de endotoxina; e que a recuperação de endotoxina deve estar entre 50% a 200%, como recomendado pela Farmacopéia Americana.

O ensaio (Pyrogen 5000 LAL) utilizado no presente trabalho possibilitou a detecção de níveis baixos de endotoxinas, como era esperado por se tratar de uma infecção com maior quantidade de bactérias Gram-positivas (Molander *et al.*, 1998; Peuciliene *et al.*, 2000; Cheung & Ho, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b). Todas as amostras de C1 e C2 apresentaram valores de PPC na faixa entre 50% a 200%.

Retratamento endodôntico: ação sobre microrganismos e endotoxinas

Microrganismos e seus subprodutos podem permanecer no sistema de canais radiculares após o tratamento endodôntico, em áreas não tocadas pelos instrumentos ou

pelas substâncias químicas empregadas, e manter ou desenvolver uma lesão perirradicular. Estas áreas incluem istmos, canais laterais ou parede dentinária localizada, especialmente na porção apical. Outros microrganismos podem realmente apresentar resistência aos agentes químicos utilizados; ou ainda podem invadir o canal radicular via microinfiltração coronária, alojar-se em espaços vazios, não ocupados pelo material obturador, encontrando substrato e interferindo negativamente no processo de reparo tecidual (Nair *et al.*, 1990; Siqueira & Rôças, 2004). Alguns fatores estão associados à manutenção de microrganismos viáveis após medidas de desinfecção do canal radicular, são eles: a) quantidade de nutrientes disponíveis, b) capacidade de sobreviver em condições de carência nutricional. Além disso, somente resultarão em fracasso endodôntico se tiverem acesso aos tecidos periapicais, se forem patogênicos e se estiverem em número suficiente para induzir ou perpetuar uma lesão periapical (Gomes *et al.*, 1996b). É importante ressaltar que a realização do retratamento endodôntico convencional, prévio a uma possível cirurgia periapical, aumenta a probabilidade de sucesso, contribuindo para o reparo apical e a sobrevivência do elemento dental (Signoretti *et al.*, 2011).

As principais causas do insucesso endodôntico estão relacionado às infecções intra-radulares persistentes ou infecções secundárias (Nair, 2004). Em casos de acidentes durante o procedimento clínico, como degraus, desvios (Signoretti *et al.*, 2011), perfurações, instrumentos fraturados e sobre-obturações, usualmente resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso. O aumento da demanda do retratamento endodôntico tem sido observado (Hülsmann & Stotz, 1997), pois os pacientes anseiam manter o dente em função na cavidade bucal sempre que possível. Diante do insucesso endodôntico, representado pela presença de sinais e/ou sintomas clínicos e radiolucência perirradicular, na imensa maioria dos casos, a infecção intrarradicular está presente, especialmente na porção apical, a reintervenção endodôntica está indicada. Em se optando pelo retratamento endodôntico, remoção do material obturador anterior, re-preparo químico-mecânico e re-obturações devem ser conduzidos de modo extremamente criterioso. O retratamento endodôntico tem o mesmo objetivo do tratamento prévio, eliminar ou reduzir substancialmente a carga microbiana dos canais radulares, restabelecendo a saúde dos tecidos periapicais.

Gomes *et al.* (1996b) estudaram em infecções endodônticas primárias a suscetibilidade da microbiota dos canais radiculares aos procedimentos químico-mecânicos, e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar completamente as bactérias do sistema de canais radiculares. Além disso, Chávez de Paz *et al.* (2003) observaram após o preparo químico-mecânico e medicação intracanal, maior frequência de isolados anaeróbios facultativos Gram-positivos, enquanto que anaeróbios Gram-negativos foram detectados em menos de 20% dos casos estudados. Os autores concluíram que esses últimos foram mais sensíveis à terapia endodôntica quando comparados aos Gram-positivos e apontaram fatores tais como estrutura da parede celular, secreção de produtos metabólicos e resistência medicamentosa como causas da alta prevalência. Vianna *et al.* (2007) e Martinho *et al.* (2008) também estudaram em infecções endodônticas primárias o efeito do preparo químico-mecânico na redução de microrganismos e endotoxinas, e observaram uma redução de 99,96%/44,4% e 99,78%/59,99%, respectivamente.

Anteriormente a este trabalho, nenhuma investigação tinha sido feita na linha de pesquisa “Microbiologia Aplicada à Endodontia” (FOP-UNICAMP), visando conhecer o comportamento da carga microbiana e endotóxica nas infecções endodônticas secundárias após o re-preparo químico mecânico, utilizando técnicas preconizadas na rotina clínica. Peciulienė *et al.* (2000) e Blome *et al.* (2008) detectaram a presença de microrganismos após o preparo do canal radicular em dentes com tratamento endodôntico prévio, corroborando com os achados do presente estudo. Esse remanescente microbiano pode estar relacionado aos procedimentos de retratamento. Trabalhos (Wilcox *et al.*, 1987; Imura *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2001) mostraram que nenhuma técnica é capaz de limpar completamente todas as paredes dos canais radiculares, especialmente no terço apical, onde os microrganismos geralmente persistem.

Suscetibilidade antimicrobiana dos *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico

No capítulo 1 deste exemplar foi utilizado o método de suscetibilidade antimicrobiana (E-test).

A efetividade de agentes antimicrobianos usados clinicamente foram avaliados por vários autores, utilizando diversos métodos, como método de difusão em disco, método de diluição em ágar e E-test.

O sistema do E-test consiste em uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 3 mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita do E-test pode detectar uma concentração inibitória mínima (CIM) que varia de 0,016 a 256 µg/mL, com um total de 29 diferentes concentrações, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993).

Muitas bactérias, clinicamente importantes, são capazes de adquirir e expressar resistência a agentes antimicrobianos comumente usados para tratar infecções, o que torna necessário, em determinadas situações, a realização de testes laboratoriais para detectar a resistência ou suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos (Finegold *et al.*, 1988; Cullman *et al.*, 1993; van Steenberg *et al.*, 1993; Barnard *et al.*, 1996). A resistência adquirida a vários agentes antimicrobianos explica a necessidade da realização de testes de suscetibilidade em todas as bactérias isoladas clinicamente significantes.

As cepas clínicas de *E. faecalis* foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana (método do E-test, AB BIODISK, Solna, Suécia). Devido à alta prevalência de *E. faecalis* nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical crônica (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003b), esses microrganismos têm o potencial de causar bacteremia e promover o desenvolvimento da endocardite bacteriana, em pacientes de risco durante o retratamento endodôntico. Estudos têm revelado um aumento

surpreendente da resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp., especialmente os isolados de infecções hospitalares (Hoellman *et al.*, 1998; Murdoch *et al.*, 2002; Shepard & Gilmore, 2002; Udo *et al.*, 2002). Eles possuem mecanismos que conferem resistência a uma variedade de antibióticos comumente utilizados na terapêutica (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Shepard & Gilmore, 2002).

Embora antibióticos não sejam comumente usados para o tratamento endodôntico de doenças crônicas, como no caso de lesões perirradiculares persistentes ao tratamento endodôntico, em pacientes de risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, eles se tornam um importante complemento à terapêutica endodôntica durante o retratamento, assim como em casos de reagudização e sintomatologia e/ou exsudato persistente (Abbott *et al.*, 1990; Grad, 1997). É importante ter conhecimento da suscetibilidade antimicrobiana das bactérias envolvidas nessas infecções endodônticas persistentes e acompanhar o padrão de sensibilidade dessas bactérias aos antibióticos observando sempre que esses padrões mudam com o surgimento de bactérias resistentes, o que torna importante o monitoramento de suscetibilidade antimicrobiana desta espécie (Finegold *et al.*, 1988; Abbott *et al.*, 1990). Assim, devido às mudanças das características de sensibilidade dos enterococos nos últimos anos, é de máxima importância traçar o perfil de sensibilidade dos *Enterococcus faecalis* isolados no insucesso endodôntico.

Resistência aos agentes antimicrobianos pode ser adquirida por uma mutação no DNA existente ou por aquisição de um novo DNA (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997). Enterococos têm adquirido determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, e, mais recentemente, vancomicina (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Mundy *et al.*, 2000; Shepard & Gilmore, 2002). Enterococos possuem mecanismos que conferem resistência a uma variedade de antibióticos, incluindo penicilina, a droga de escolha (Hoellman *et al.*, 1998; Shepard & Gilmore, 2002). Esses microrganismos apresentam resistência intrínseca a certos antibióticos como a cefalosporina, clindamicina e aminoglicosídeos (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997). Além da resistência intrínseca, enterococos têm adquirido determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, e, mais recentemente, vancomicina (Murray, 1990;

Morrison *et al.*, 1997; Mundy *et al.*, 2000; Shepard & Gilmore, 2002). Resistência à eritromicina tem sido relatada entre enterococos isolados em infecções orais e sistêmicas (Udo *et al.*, 2002; Sedgley *et al.*, 2004).

Cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* isoladas de infecções endodônticas têm demonstrado resistência bacteriana ao regime terapêutico convencional recomendado para procedimentos odontológicos. Dahlén *et al.* (2000) encontraram cepas de enterococos resistentes a benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina; enquanto Noda *et al.* (2000) encontraram cepas resistentes a cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina. Pinheiro *et al.* (2003a) encontraram cepas de *E. faecalis* resistentes aos macrolídeos: eritromicina e azitromicina. Portanto, muitos antibióticos, tradicionalmente utilizados nas infecções odontogênicas, podem ser ineficazes contra *E. faecalis*, e informações sobre drogas alternativas se tornam necessárias.

Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico e lesão periapical persistente. *E. faecalis* foram totalmente suscetíveis *in vitro* à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, vancomicina e moxifloxacina, corroborando com os achados do presente estudo. Pinheiro (2005) observou que a maioria das cepas foi suscetível ao cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacina, entretanto é importante ressaltar que no presente estudo o antibiótico ciprofloxacina apresentou uma suscetibilidade para apenas 50% das cepas. Desde os estudos de Pinheiro *et al.* (2004) a eritromicina e a azitromicina apresentaram baixa suscetibilidade, 28% e 14%, respectivamente. Em nosso estudo e de Delboni (2009) todas as cepas de *E. faecalis* não foram suscetíveis à azitromicina (AZ) e eritromicina (EM), sendo 66,7% (AZ)/25% (EM) e 71% (AZ)/20% (EM), respectivamente, das cepas resistentes aos dois antibióticos, sendo estes os antimicrobianos menos efetivos.

Fatores de virulência dos *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico

No capítulo 1 deste exemplar foi utilizada a metodologia de PCR para detecção dos fatores de virulência.

Os fatores de virulência mais citados na literatura são a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipoteicóico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Cada um desses fatores pode estar associado a vários estágios de infecções endodônticas, bem como à inflamação periapical. No presente estudo, os fatores de virulência das cepas de *E. faecalis* analisados por meio da reação em cadeia da polimerase foram: antígeno de endocardite (*efaA*), as substâncias de codificação de agregação (*asa* e *asa373*), a produção de gelatinase (*gelE*), os fatores de aderência (*esp* e *ace*) e o ativador de citolisina (*cylA*).

Antígeno de endocardite: *efaA*

O gene *efaA* foi identificado com a utilização de um anti-soro a partir de um paciente com endocardite e *E. faecalis* (Lowe *et al.*, 1995). A sequência de aminoácidos da proteína associada, *efaA*, revelou homólogo em 55 a 60% a um grupo de proteínas de estreptococos conhecida como adesinas. Assim, a hipótese foi de que *efaA* pode estar funcionando como uma adesina na endocardite. É comum a produção de *efaA* por cepas de *E. faecalis*. Em um estudo, o gene *efaA* foi detectado em sangue, pus, urina, fezes, ambiente hospitalar e em quase todos os alimentos (leite, queijo, carne) isolados de *E. faecalis* (Eaton e Gasson, 2001). Em um modelo animal, mutantes com o gene *efaA* mostrou sobrevivência prolongada, em comparação com as cepas de *E. faecalis* sem o gene *efaA*, indicando papel deste gene na doença (Singh *et al.*, 1998). Estudos sugerem *efaA* como uma proteína de ligação ao receptor por meio de um sistema de transporte de manganês em *E. faecalis*. Enquanto o manganês é necessário para o crescimento e sobrevivência da maioria dos microrganismos, *efaA* é fortemente expressada em um ambiente com pouco íon manganês, provavelmente para a regulação da homeostase citoplasmática do cation (Low *et al.*, 2003).

A disponibilidade relativamente baixa de manganês no soro (Krachler *et al.*, 1999) e em dentina (Battistone *et al.*, 1967) podem induzir a expressão de *efaA* in vivo.

Efa A foi encontrado em todos *E. faecalis* isolados.

Substância de Agregação: *asa* e *asa373*

A substância de agregação (AS) é uma adesina bacteriana, codificada por plasmídeo, que responde a ferormônios e que realiza eficiente contato entre hospedeiro e receptor bacteriano, facilitando a troca de plasmídeos (Kreft *et al.*, 1992). Esse contato depende de uma substância ligante, que também é codificada por plasmídeos. Espécies que não são codificadas por essa substância ligante não conseguem eficiente ação da AS (Kayaoglu & Orstavik, 2004). A substância agregadora é de natureza protéica e sua expressão na superfície da célula pode ser induzida por soro (Kreft *et al.*, 1992). A *asa373* pertence à família da AS, diferindo, porém em sua estrutura protéica. A AS tem sido responsável por promover adesão direta, independente de opsonina, de *E. faecalis*, a neutrófilos humanos pelo mecanismo mediado por receptores do sistema complemento, tornando essas cepas de *E. faecalis* resistentes à fagocitose por neutrófilos (Vanek *et al.*, 1999; Kayaoglu & Orstavik, 2004). Espécies que possuem AS realizam produção extracelular de superóxidos, os quais contribuem para o dano tecidual em infecções dominadas por *E. faecalis*. A associação da AS com a substância ligante apresenta atividade de superantígeno (Schlievert *et al.*, 1998), levando à proliferação de linfócitos T, com subsequente liberação de TNF beta e interferon gama, os quais estimulam a liberação de TNF alfa pelos macrófagos, atuando na reabsorção óssea. Interferon gama ativa a produção de agente citotóxico ácido nítrico, o que leva à destruição celular (Kayaoglu & Orstavik, 2004).

Asa foi encontrado em 83,3% dos *E. faecalis* isolados, enquanto que *Asa 373* não foi encontrado em nenhum.

Gelatinase: *gelE*

A gelatinase é uma protease metaloendopeptidase extracelular, codificada pelo

gene *gelE*, composta por zinco, purificada e descrita em 1964 (Bleiweis, 1964). Ela pode hidrolisar gelatina, colágeno, fibrinogênio, caseína, hemoglobina e insulina. A gelatinase é produzida por um grande número de células eucarióticas, pois, no hospedeiro, faz parte de processos fisiológicos normais, como regulação na formação e na remodelação tecidual. No entanto, no caso de indivíduos com periodontites com grande quantidade de *E. faecalis*, os níveis de gelatinase no fluido gengival e na saliva são elevados. Assim, a hidrólise de colágeno pela gelatinase produzida por *E. faecalis* pode ter papel importante na patogênese e na propagação de inflamações periapicais (Mäkelä, 1994; Soell *et al.*, 2002). Sedgley *et al.* (2005b) evidenciaram que a expressão do *gelE* está associada à adesão do *E. faecalis* à dentina, in vitro, e, portanto, associada à formação de biofilme nos canais radiculares.

Gel E foi encontrado em 91,6% dos *E. faecalis* isolados.

Fator acessório de colonização: *ace*

O fator de colonização resulta da expressão do gene *ace*. Este codifica uma estrutura bacteriana de superfície que reconhece e estabelece a ligação a proteínas presentes em células do hospedeiro como a laminina e o colágeno tipo I e tipo IV. O fator acessório de colonização existe de uma forma mais comum em cepas de *E. faecalis* (Rich *et al.*, 1999; Nallapareddy *et al.*, 2000). Essa adesina intercede na ligação ao colágeno, fibronectina e laminina da matriz extracelular do hospedeiro e parece executar papel importante na patogênese da endocardite (Nallapareddy *et al.*, 2000).

Ace foi encontrado em todos *E. faecalis* isolados.

Proteína de superfície: *esp*

A proteína *esp*, codificada pelo gene *esp*, detectado em casos de bacteremia, mas não em indivíduos saudáveis (Shankar *et al.*, 1999; Kayaoglu & Orstavik, 2004). O gene estrutural é único, mas pode permitir formas alternativas da expressão da proteína de superfície extracelular (*esp*, do inglês “*Enterococcal Surface Protein*”), a qual está localizada na superfície da parede celular e cujas variações na estrutura podem contribuir para a habilidade de *E. faecalis* em não ser detectado pelo sistema imunológico em um

hospedeiro e persistir nos sítios de infecção (Shankar *et al.*, 1999). Essa proteína participa da formação de biofilme por *E. faecalis*, e, possivelmente, essa forma de organização auxilia a bactéria a resistir ao efeito bactericida da medicação de hidróxido de cálcio em canais radiculares infectados (Distel *et al.*, 2002; Kayaoglu & Orstavik, 2004).

Esp foi encontrado em 25%, dos *E. faecalis* isolados.

Citolisina: *cylA*

A citolisina pode ser definida como uma toxina proteica hemolítica (Eaton & Gasson, 2001) e está associada à virulência em modelos animais (Jett *et al.*, 1992). Além das suas funções tóxicas, funciona como uma bacteriocina, frente a um grande número de bactérias Gram-positivas. No exterior da célula, o produto do gene *cylA* (protease de serina ativadora extracelular), é responsável pela ativação dos componentes precursores da citolisina. É também, importante salientar, que a citolisina para além de proporcionar a toxicidade de infecções em vários modelos animais, está relacionada com o aumento do risco de morte súbita em casos de bacteremia nosocomial (Poeta *et al.*, 2008).

CylA foi encontrado em 16,6% dos *E. faecalis* isolados.

Concluindo, em nosso estudo, as cepas clínicas de *E. faecalis* isoladas dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico apresentaram resultados positivos para *efa* (100%), *ace* (100%), *gelE* (91,6%), *asa* (83,3%), *esp* (25%) e *cylA* (16,6%). O gene *asa373* não foi detectado em nenhuma cepa igualmente ao trabalho de Delboni (2009). Além disso, Delboni (2009) também não detectou o fator *cylA*. Estes resultados corroboram com o estudo de Sedgley *et al.* (2005b) que detectou os fatores *asa*, *ace*, *efaA* e *gelE* em 100% das amostras, o gene *cylA* em 18%, sendo que o gene *asa373* não foi detectado em nenhuma amostra. Entretanto, Sedgley *et al.* (2005b) encontraram 61% do gene *esp* enquanto no presente estudo o gene *esp* foi detectado em 25% igualmente ao estudo de Reynaud af Geijersstam *et al.* (2007).

CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias propostas nos respectivos capítulos foi possível concluir que:

1) A percentagem de *E. faecalis* encontrada nos canais variou dependendo da técnica empregada. Todos os *E. faecalis* isolados apresentaram fatores de virulência relacionados a aderência (genes *ace* e *efa*). Foi observada resistência frente a alguns antibióticos comumente utilizados na Odontologia. **(Capítulo 1).**

2) Foram encontrados microrganismos e endotoxinas em todos os canais radiculares, antes e após o preparo químico-mecânico. Os níveis de endotoxinas presentes inicialmente nos canais apresentaram associação com o tamanho da lesão periapical. O PQM com clorexidina 2% gel + EDTA 17% foi efetivo na redução da carga bacteriana e dos níveis de endotoxinas nos casos de infecção endodôntica secundária. **(Capítulo 2).**

REFERÊNCIAS

Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. Aust Dent J. 1990; 35(1): 50-60.

Al-Haroni M. Bacterial resistance and the dental professionals role to halt the problem. J Dent. 2008; 36(2): 95–103.

Barnard D, Davies J, Figdor D. Susceptibilities of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. Int Endod J. 1996; 29(5): 320-6.

Battistone GC, Feldman MH, Reba RC. The manganese content of human enamel and dentine. Arch Oral Biol. 1967; 12(10): 1115-22.

Beutler B. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. Curr Opin Microbiol. 2000; 3(1): 23-8.

Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens. J Bacteriol. 1964; 88: 653-9.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23(5): 384-90.

Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with E-test. Clin Infect Dis. 1993; 16: S367-70.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res. 1981; 89(4): 321-8.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983; 55(3): 307-12.

Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(3): 85-91.

Chan Y, Chan CH. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003; 36(2): 105–10.

Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003; 36(7): 500-8.

Cheung GS. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J*. 1996; 46(3): 131-8.

Cheung GSP, Ho MWM. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(6): 332-7.

Cullmann W, Frei R, Krech T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy*. 1993; 39(3), 169-74.

Cunha RS, De Martin AS, Barros PP, da Silva FM, Jacinto RC, Bueno CE. In vitro evaluation of the cleansing working time and analysis of the amount of gutta-percha or Resilon remnants in the root canal walls after instrumentation for endodontic retreatment. *J Endod*. 2007; 33(12): 1426-8.

Dahlén G, Pipattanakorn P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 1993; 8(6): 375-82.

Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15(5): 309-12.

Delboni MG. Identificação dos microrganismos presentes na saliva, na coroa dental e no canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico e análise da suscetibilidade antimicrobiana, dos fatores de virulência e da diversidade genética dos *Enterococcus faecalis* isolados [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28(10): 689-93.

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(4): 1628-35.

Endo MS. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2011.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JFA, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(10): 2575-83.

Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G. Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy.* 1964;15: 257–70.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 27(7): 452-5.

Ferreira JJ, Rhode JS, Pitt Ford TR. The efficacy of gutta-percha removal using ProFiles Int Endod J. 2001; 34(4): 267-74.

Finegold SM & National committee for clinical laboratory standards working group on anaerobic susceptibility testing. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 1988; 26: 1253-6.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20(5): 289-95.

Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99(1): 112-8.

Friedman S, Stabholz A, Tamse A. Endodontic retreatment case selection and technique. Part 3: retreatment techniques. J Endod. 1990; 16(11): 543-9.

Goldberg F, Marroquín BB, Frajlich S, Dreyer C. In vitro evaluation of the ability of three apex locators to determine the working length during retreatment. J Endod. 2005; 31(9): 676-8.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J. 1994a; 27(6): 291-298.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. Microbios. 1994b; 80(325): 231-243.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J. 1996a; 29: 69-75.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*. 1996b; 29(4): 235–41.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA et al. Microbiological examination of infected root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(2): 71-6.

Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR *et al*. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(4): 211-5.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2007; 33(9): 1049-52.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2008a; 34(5): 537-40.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008b; 105(4): 519-25.

Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009; 35(10): 1350-3.

Gomes BPFA, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod*. 2011; 37(8): 1058-62.

Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. J Endod. 2012; 38(8): 1082-6.

Grad HA. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. Alpha Omegan. 1997; 90(4): 64-72.

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 91(5): 579-86.

Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 1-9.

Hoellman DB, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Activities and time-kill studies of selected penicillins, β -lactamase inhibitor combinations, and glycopeptides against *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(4): 857-61.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM *et al.* The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004; 33(3): 162-9.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991; 71(4): 492-5.

Hülsmann M, Stotz S. Efficacy, cleaning ability and safety of different devices for gutta-percha removal in root canal retreatment. Int Endod J. 1997; 30(4): 227-33.

Imura N, Kato AS, Hata GI, Uemura M, Toda T, Weine F. A comparison of the relative efficacies of four hand and rotary instrumentation techniques during endodontic retreatment. *Int Endod J*. 2000; 33(4): 361-6.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005; 54(8): 777-83.

Jett BD, Jensen HG, Nordquist RE, Gilmore MS. Contribution of the pAD1-encoded cytolyisin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun*. 1992; 60(6): 2445-52.

Johnson AP. The pathogenicity of enterococci. *J Antimicrob Chemother*. 1994; 33(6): 1083-9.

Khazzab MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(5): 587-93.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965; 20: 340-9.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(5): 308-20.

Krachler M, Rossipal E, Micetic-Turk D. Concentrations of trace elements in sera of newborns, young infants and adults. *Biol Trace Elem Res*. 1999; 68(2): 121-35.

Kreft B, Marre S, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*. 1992; 60(1): 25-30.

Leonardo ML, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12(2): 93-8.

Low YL, Jakubovics NS, Flatman JC, Jenkinson HF, Smith AW. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 113-9.

Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun.* 1995; 63(2): 703-6.

Mäkelä M. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994; 73(8): 1397-406.

Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008; 34(3): 268-72.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *J Endod.* 2010a; 36(9): 1467-74.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with Rotary NiTi files in the removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod.* 2010b; 36(11): 1766-9.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod.* 2011; 37(2): 163-7.

Matsuo RJ. Acute pulpal-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assesment of antibiotic effectiveness against microbes isolated from intact teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981; 52(2): 187-96.

Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. *J Calif Dent Assoc.* 2011; 39(3): 158-61.

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

Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr.* 1966; 74 (spec issue): 1–380.

Monnet DL, Kristinsson KG. Turning the tide of antimicrobial resistance: Europe shows the way. *Euro Surveill* 2008;13(46): 19039.

Morrison D, Woodford N, Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1997; Series 26, 89S–99S.

Mundy LM, Saham DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(4): 513–22.

Murdoch DR, Mirrett S, Harrell LJ, Monahan JS, Reller LB. Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal bloodstream isolates over 25 years. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2002; 46(11): 3676-8.

Murray BE. The life and times of the enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3(1): 46-65.

Murray BE. Diversity among multidrug-resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4(1): 37-47.

Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990; 16(12): 580–8.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 348–81.

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun.* 2000; 68(9): 5218-24.

Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2000; 26(4): 221-4.

Nord CE, Wordström T. Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics in vitro. *Acta Odontol Scand.* 1973; 31(6): 395-9.

Novitsky TJ, Roslansky PF, Siber GR, Warren HS. Turbidimetric method for quantifying serum inhibition of Limulus amoebocyte lysate. *J Clin Microbiol.* 1985; 21(2): 211-6.

Öcek Z, Sahin H, Baksi G, Apaydin S. Development of a rational antibiotic usage course for dentists. *Eur J Dent Educ.* 2008; 12(1): 41–7.

Owens RC Jr. An overview of harms associated with b-lactam antimicrobials: where do the carbapenems fit in? *Crit Care.* 2008; 12: 1–11.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 2000; 26(10): 593-5.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34(6): 429-34

Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J*. 2002; 35(8): 698–702.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003a;18(2): 100 –3.

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

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canal of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2004; 37(11): 756-63.

Pinheiro ET. Estudo da microbiota de canais de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais e da suscetibilidade de *Enterococcus faecalis* a diferentes antimicrobianos. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Poeta P, Igrejas G, Costa D, Sargo R, Rodrigues J, Torres C. Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *J Basic Microbiol*. 2008; 48(5): 385-92.

Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1992; 7(4): 249-52.

- Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz, S, Narayama SV, Weinstock GM et al. 1999. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*. 1999; 274(38): 26939-45.
- Reynaud af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Røslie E, Peciuliene V, Haapasalo M et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(2): 87–94.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004; 30(5): 315-20.
- Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira Jr JF. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod*. 2008; 34(8): 926-31.
- Rocha RA, Silva RA, Assed S, Medeiros AI, Faccioli LH, Pécora JD *et al*. Nitric oxide detection in cell culture exposed to LPS after Er:YAG laser irradiation. *Int Endod J*. 2009; 42(11): 992-6.
- Rodriguez-Nuñez A, Cisneros-Cabello R, Velasco-Ortega E, Llamas-Carreras JM, Tórres-Lagares D, Segura-Egea JJ. Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society. *J Endod*. 2009; 35(9): 1198–203.
- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9): 3282–9.
- Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. Mechanisms of microbial disease. 3th edition, Ed. Lippincott, Williams & Wilkins; 1999.

Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoeck JA, Harmata JW et al. Aggregation and binding substance enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun*. 1998;66(1): 218-23.

Schirmer JF, Meyer KM, Hermanns P, Altenburger MJ, Wrbas KT. Effectiveness of hand and rotary instrumentation for removing a new synthetic polymer-based root canal obturation material (Epiphany) during retreatment. *Int Endod J*. 2006; 39(2): 150–6.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(2): 95-101.

Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander AL. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol*. 2005a; 50(6): 575-83.

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol*. 2005b; 20(1): 10-9.

Shah HN, Garbisa SE. Studies on the physiology and ecology of black-pigmented Gram-negative anaerobes which may be important in disease development. *Immunol Med Microbiol*. 1993; 6(2-3): 165-72.

Shankar V, Baghdadyan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 1999; 67(1): 193-200.

Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect*. 2002; 4(2): 215–24.

Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod.* 2011; 37(12): 1696-700.

Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* efaA mutant and use of efaA homologs for species identification. *Immunol Med Microbiol.* 1998; 21(4): 323-31.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infections. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(3): 512-30.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 1-10.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent.* 2003; 31(5): 333-9.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction - based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1), 85-94.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005a; 31(6): 411-23.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2—redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005b; 31(7): 488-98.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30(5): 297–306.

Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res*. 2002; 81(3): 174-8.

Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*. 2005; 11(1/2): 79-91.

Stern MH, Dreizen S, Ott TW, Levy BM. Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 69(3): 366-71.

Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors: an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontol Scand*. 1956; 14: suppl 21, 1-175.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod*. 1998; 85(1): 86-93.

Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*. 1998; 31(5): 311-25.

Tronstad L, Kreshtool D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6(3): 129-36.

Udo EE, Al-Sweih N, John P, Chugh TD. Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43(3): 233-8.

Vaara M, Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel, E.T. (Ed.), *Handbook of*

Endotoxin. 1984; vol. 1. Elsevier, Amsterdam, pp. 1 – 45.

Van Steenberghe TJ, Van Winkelhoff AJ, Graaf J, Duerden BI Antibiotic susceptibilities of black pigmented Gram-negative anaerobes. *Immunol Med Microbiol.* 1993; 6(2-3): 229-33.

Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(8): 893–8.

Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunne GM, Rakita RM. Enterococcus faecalis aggregation substance promotes opsonin independent binding to human neutrophils via complement receptor type 3-mediated mechanism. *Immunol Med Microbiol.* 1999; 26(1):49-60.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6):1–8.

Wilcox LR, Krell KV, Madison S, Rittman B. Endodontic retreatment: evaluation of gutta-percha and sealer removal and canal reinstrumentation. *J Endod.* 1987; 13(9): 453-7.

COLETA DAS AMOSTRAS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

1.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

Foram selecionados 30 pacientes indicados ao retratamento endodôntico, com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical. Os dentes unirradiculares selecionados apresentavam insucesso endodôntico e selamento coronário. Nenhum dos casos selecionados apresentavam dor espontânea, doença periodontal, fístula, edema, fratura radicular e exposição da câmara pulpar; uso de antifúngicos e antibióticos (< 3 meses); impossibilidade de isolamento absoluto e inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho.

1.2 Aspectos clínicos e radiográficos

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

Durante o exame clínico foram anotadas informações sobre o dente a ser retratado e sua condição atual em relação à qualidade da restauração, ao tipo da restauração ou coroa, à presença ou ausência de cárie, infiltração coronária e fratura. Verificaram-se presença ou ausência de dor, natureza da dor, história de dor prévia, dor à percussão (horizontal e vertical) e à palpação, presença ou ausência de edema dos tecidos periapicais, fístulas, mobilidade

dental e bolsa periodontal. Durante a coleta o aspecto físico do canal radicular também foi observado. Todas essas características clínicas referentes ao dente investigado foram anotadas na ficha clínica de cada paciente.

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

- a. Presença de imagem de cárie sob a restauração sugerindo uma infiltração coronária. Considerou-se restauração “boa” quando adaptada radiograficamente, e “ruim” quando havia falha na margem e presença de espaços vazios entre o material restaurador e o dente;
- b. Limite da obturação dos canais radiculares, sendo que este foi classificado em intervalos de ≤ 2 mm e > 2 mm do ápice e sobre-obturados;
- c. Qualidade do tratamento endodôntico: considerado “bom” quando a guta-percha apresentava compactada e radiograficamente não se observava áreas radiolúcidas na massa obturadora ou entre o material obturador e a parede do canal, com limite da obturação entre 0-2 mm do ápice. Foi considerado “ruim” quando havia radiolucidez na massa obturadora, guta-percha não compactada, espaços vazios na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, ou com limite da obturação maior que 2 mm do ápice radiográfico;
- d. Tamanho da lesão periapical relacionado ao dente tratado endodonticamente, divididos nas categorias ≤ 5 mm e > 5 mm;
- e. Presença ou ausência de pino intrarradicular;
- f. Presença ou ausência de prótese definitiva ou provisória.

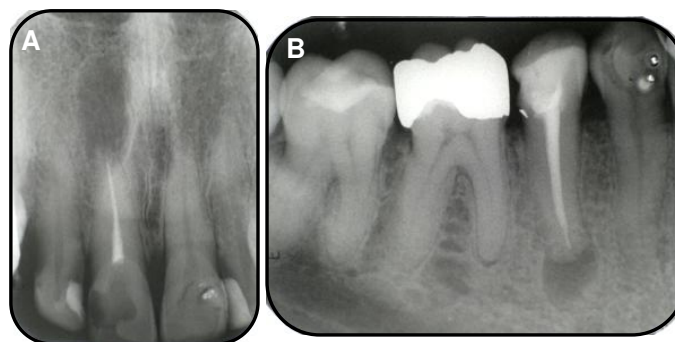


Figura 1. Radiografia periapical de dentes indicados ao retratamento endodôntico: **A.** Incisivo central superior direito. **B.** Segundo pré-molar inferior direito.

1.3 Coletas das amostras

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

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

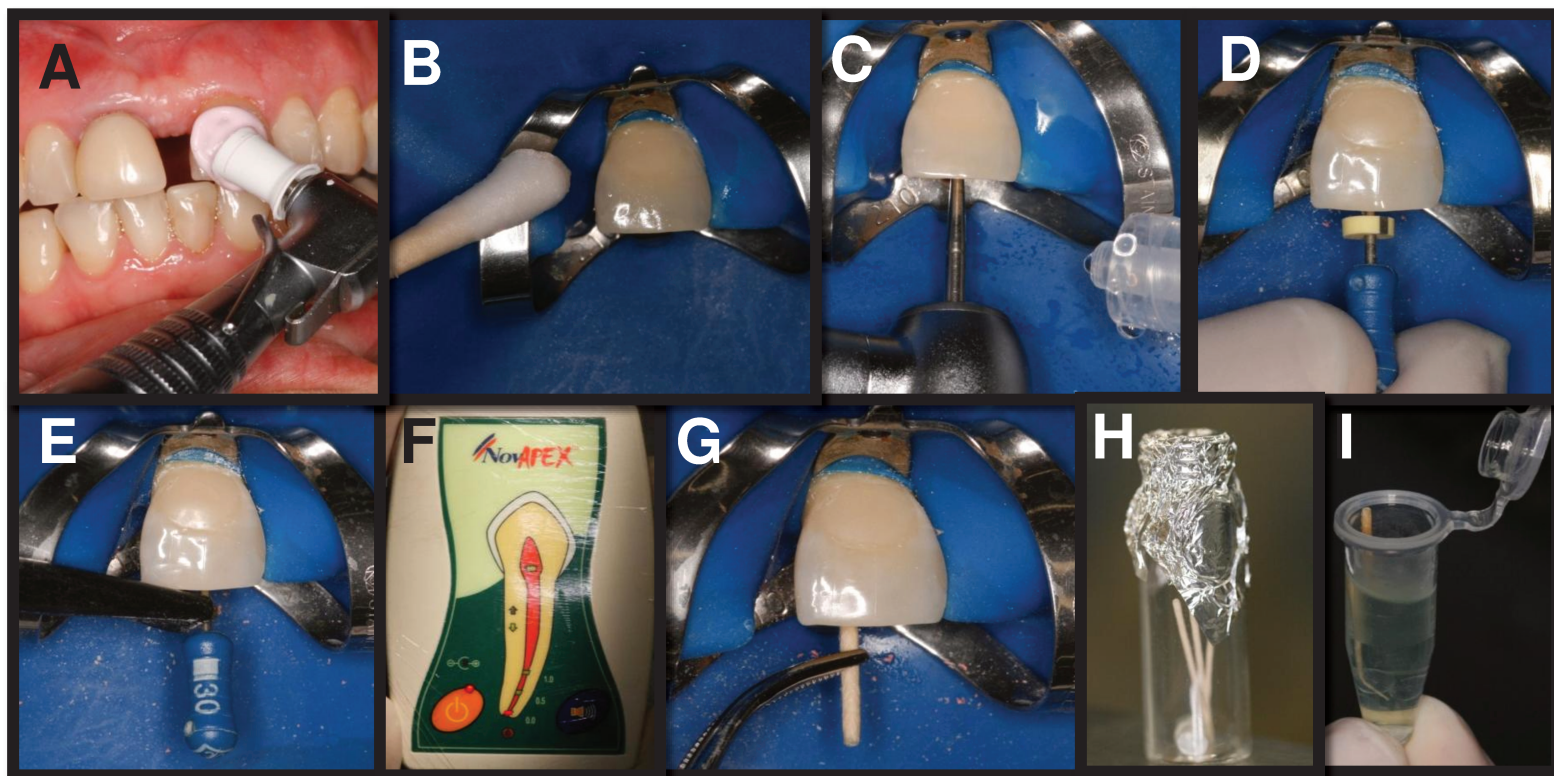


Figura 2. Coleta do canal radicular: A – Profilaxia, B – Descontaminação do campo operatório, C – Abertura coronária, D – Remoção do material obturador do canal radicular, E – Determinação do comprimento de trabalho, F – Localizador apical para realização da odontometria eletrônica, G – Coleta inicial,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

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

1.4 Preparo do campo operatório

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

1.5 Procedimentos clínicos: abertura coronária, preparo químico-mecânico (PQM) e obturação dos canais radiculares

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

Finalizada a abertura coronária, seguiu-se para a remoção do material obturador sem o uso de solventes. Quando uma lima K (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) ajustada no interior do canal radicular alcançava o comprimento aparente do dente determinado radiograficamente, fazia-se uso do localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-zion, Israel) para verificar a patência (desobstrução apical) e obter o comprimento de trabalho (CT). O CT foi estabelecido utilizando uma lima K ajustada em toda extensão do canal radicular, ou seja, equivalente ao “zero” sinalizado no localizador apical (**Figura 2**). Nesse momento foi determinado a lima anatômica inicial (LAI), que representa o calibre que melhor se ajusta no forame apical. Com auxílio do microscópio clínico (Opto Eletrônica S.A., São Carlos, SP) e radiografia periapical verificou-se a ausência do material obturador no interior do canal radicular e realizou-se a coleta inicial (**C1**).

A câmara pulpar foi descontaminada com 1,0 mL de CLX 2% gel (Endogel, Itapetininga, SP). O terço apical foi preparado em toda extensão do canal radicular. Durante o preparo químico-mecânico (PQM), os canais foram totalmente preenchidos com CLX 2% gel a cada início do uso de lima e irrigados sequencialmente com 4,0 mL de soro fisiológico estéril. Após a instrumentação, foi confirmada a patência com a LAI e os canais foram irrigados com 4,0 mL de solução de *tween* 80 0,5% + lecitina de soja 0,07%, para neutralizar a ação da substância química auxiliar, seguido uma nova irrigação com 4,0 mL de solução fisiológica estéril. Posteriormente, 1,0 mL de EDTA 17% (ácido etilenodiaminotetracético) foi inserido no interior do canal radicular por 3 minutos sob agitação com uma lima manual estéril

e apirogênica tipo K #15. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril. Após o PQM, foi realizada a segunda coleta (**C2**) respeitando os mesmos princípios de coleta (endotoxina e microbiológico) e processamento da amostra C1.

1.6 Processamento das amostras

1.6.1 Caracterização microbiana através da técnica de cultura microbiana

1.6.1.1 Inoculação, incubação e isolamento bacteriano

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

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

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

quais foram incubadas na câmara de anaerobiose a 37°C, numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios estritos de crescimento lento.

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

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

- Placas de Ágar m-Enterococcus (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) – incubadas em aerobiose a 37°C, por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de *Enterococcus* spp.
- Placas de Ágar Mitis Salivarius (Difco BD, Sparks, Maryland, EUA) – incubadas em aerobiose a 37°C, por 2 dias, seletivo para *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Enterococcus* spp.

1.6.1.2 Cultivo, isolamento, incubação e identificação dos microrganismos

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

O número de UFCs foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas contendo o meio de cultura FAA analisadas. Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 2.000 ou 200.000 o número de UFCs observadas na contagem das placas, dependendo da diluição realizada. A escolha da placa para contagem de UFCs estava relacionada à possibilidade de contar de

forma individual o número de UFCs presentes. Quando não possibilitado a contagem na amostra inicial, foram utilizadas as diluições 10^{-2} ou 10^{-4} . Ou seja, quando a diluição 10^{-2} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 100 vezes menor que o inicial (1 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1,0 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 2.000. Entretanto, quando a diluição 10^{-4} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 10.000 vezes menor que o inicial (1 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1,0 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 200.000.

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

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

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

Foram utilizados testes bioquímicos padronizados (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, França) para especificação dos organismos isolados. Esses testes possuem reagentes que após a inoculação da suspensão bacteriana, evidenciam as exigências nutricionais e compostos específicos produzidos, pela mudança de cor, em determinados

períodos. Os Kits fornecem gabaritos para finalizar a identificação, que pode ser verificada através o site: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>.

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

- API 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase-negativa).

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

MEIO DE TRANSPORTE**VMGA III (Viability Medium Göteborg Ágar)****1. Descrição**

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

2. Preparo do meio**2.1. Componentes necessários**

- a) Acetato de fenilmercúrio (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. P5554 – 25 g;
- b) Glicerofosfato de sódio (Merck, Alemanha), Ref. 4168 – 25 g;
- c) CaCl anidro ou CaCl₂.6H₂O (Ecibra, Santo Amaro - SP, Brasil), Ref. 0490 – 500 g;
- d) KCl (Synth, Diadema, São Paulo - SP, Brasil), Ref. C1058.01.AG – 500 g;
- e) MgSO₄.7H₂O (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. M1880 – 500 g;
- f) NaOH (Dinâmica, Brasil), Ref. CAS1310-73-2 cod. 1702-1 – 500 g;
- g) Ágar bacteriológico (Acumedia, EUA), Ref. 7178A – 500 g;
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA), Ref. 214340 – 500 g;
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA), (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. T4532 – 100 g;
- j) Thiotona ou Peptona (BBL, Cockeysville, EUA), (Biobrás, MG, Brasil), Ref.177-2 – 500 g;
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. C4820 – 25 g;

- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. T3758 – 500 mL.

Autoclavar previamente:

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

2.2. Preparo dos volumes líquidos

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

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

*Colocar um peixinho para ajudar a dissolver a gelatina

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

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

2.3. Solução de Sais de Estoque IV

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

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

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

No dia anterior, preparar as soluções:

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

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

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

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

2.4. Mistura das soluções e preparo do VMGA III

a) Solução A:

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

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

b) Solução B:

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

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

c) Solução C:

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

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

d) Solução D:

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

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

e) Solução E:

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

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

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

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

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

MEIOS DE CULTURA**1. Fastidious Anaerobe Ágar (FAA) (LAB M, Bury, UK.), Ref. Lab 90 – 500 g****1.1 Descrição**

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

Agentes específicos de estimulação de crescimento:

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

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

1.2. Preparo

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

1.3. Armazenagem do meio preparado

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

1.4. Incubação

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

1.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Ágar nº 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
L-cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5

1.6. Enriquecimento do Meio

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

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

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

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

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

2.1. Descrição

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

2.2. Preparo

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

2.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, por até 3 meses, a 15-20 °C, fora do alcance da luz.

2.4. Incubação

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

2.5. Fórmula

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

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

3.1 Descrição

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

3.2 Preparo

Adicionar 24,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 12°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje, adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de Petri.

3.3. Armazenagem

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

3.4 Incubação

Tempo e temperatura são determinados para cada microrganismo.

3.5 Fórmula

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

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

4.1. Descrição

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

4.2. Preparo

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

4.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C protegidos da luz.

4.4. Incubação

Incubar aerobicamente a 37 °C por até 15 dias.

4.5. Fórmula

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

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

5.1. Descrição

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

5.2. Preparo

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

5.3. Armazenagem

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

5.4. Incubação

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

5.5. Fórmula

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

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

6.1. Descrição

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

6.2. Preparo

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

6.3. Armazenagem

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

6.4. Incubação

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

6.5. Fórmula

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

COLORAÇÃO DE GRAM**1. Princípios**

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

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

2. Componentes

a) Cristal Violeta

Componente	Quantidade
Cristal violeta	2 g
Álcool etílico a 95%	20 mL
Oxalato de NH ₄	0,8 g
Água destilada	100 mL

b) Iodo de Gram

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

c) Descorante

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

d) Contracoloração

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

3. Procedimentos

- Fazer sobre uma lâmina um esfregaço delgado do material em estudo e deixar secar no ar.
- Fixar o material na lâmina, utilizando-se o calor da chama no Bico de Bunsen.
- Colocar a lâmina em um suporte para coloração.
- Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, por 1 minuto. Lavar em água corrente.
- Cobrir o esfregaço com a solução de iodo de Gram, por um minuto. Lavar em água corrente.
- Aplicar o decolorante por 15 segundos sobre a lâmina.
- Imediatamente, cobrir a lâmina com contracolorante, por 30 segundos a 1 minuto.
- Deixar secar no ar, colocando a lâmina em posição vertical.
- Examinar em microscópio óptico, com óleo de imersão, com aumento de x100.

TESTE DA CATALASE**1. Procedimentos**

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

2. Interpretação dos resultados

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

KITS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

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

1.1. Descrição

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

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

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

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

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

1.2. Procedimentos para identificação

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

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

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

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

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

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

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

EXTRAÇÃO DO DNA MICROBIANO

Extração de DNA foi realizada das 30 amostras coletadas dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33099), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037), *Prevotella tanneriae* (ATCC 51259), *Treponema denticola* (ATCC 35405), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Treponema socranskii* (35536), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 15033) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 4034) foram utilizados como controle das reações de PCR.

Os procedimentos de extração (**Figura 3**) foram realizados utilizando-se o conjunto QIAamp DNA mini Kit. (QIAGEN, Valência, Califórnia, EUA, Ref. 51306 – 250 reações).

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

- 17-** Transferir o filtro para um *eppendorf* normal de 1,5 mL com tampa.
- 18-** Adicionar 100µl do eluente AE (6).
- 19-** Aguardar 3 min.
- 20-** Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
- 21-** Guardar o DNA extraído a -20°C.

APÊNDICE 8

MÉTODOS PARA REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES DE PCR

PREPARO DOS *PRIMERS*

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

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

IMPORTANTE:

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

A MOLARIDADE expressa a concentração de uma solução em Molar.

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

Por sua vez, 1 mol de soluto = massa molecular em gramas do soluto.

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

Por isso, quando misturarmos o *primer* (pó) que está na concentração em nmol com 1 mL de água, vamos obter a concentração da mistura em μM .

$$1 \text{ n mol} / 1 \text{ mL} = 1.10^{-9} \text{ mol} / 1.10^{-3} \text{ L} = 1.10^{-6} \text{ mol/L} = 1.10^{-6} \text{ M} = 1\mu\text{M}$$

PREPARO DAS dNTPs (100 mM dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, cod 10297-018)

Solução Original

Na caixa há quatro tubos com 250 μL de cada dNTP.

Preparo da SOLUÇÃO MÃE a partir da Solução original

Segundo o fabricante, se pipetarmos volumes iguais de cada uma das dNTPs e misturarmos em um *Eppendorf*, obteremos uma Solução Mãe com uma molaridade de 25 mM.

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

5 μL de ANTP + 5 μL de GNTTP + 5 μL de CNTTP e 5 μL de TNTTP

Solução Mãe com $V_{\text{FINAL}} = 20 \mu\text{L}$ e $M_{\text{FINAL}} = 25 \text{ mM}$.

Preparo da SOLUÇÃO DE TRABALHO a partir da Solução Mãe

Esta solução terá um volume final de 100 μL com uma molaridade final de 2,5 mM.

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$M_{\text{mãe}} = 25 \text{ mM}, V_{\text{mãe}} = ?$$

$$M_{\text{trabalho}} = 2,5 \text{ mM}, V_{\text{trabalho}} = 100 \mu\text{L}$$

Preciso saber o quanto em volume eu tenho que pegar da SOLUÇÃO MÃE e misturar em água milli-Q para obter uma SOLUÇÃO DE TRABALHO a 2,5 mM e num volume de 100 μL .

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$25 \text{ mM} \times V_{\text{mae}} = 2,5 \text{ mM} \times 100 \text{ }\mu\text{L}$$

$$V_{\text{mae}} = 10 \text{ }\mu\text{L}$$

Pegar $V_{\text{mae}} + V_{\text{agua milliQ}}$ suficiente para completar 100 μL .

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

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

PREPARO DA MISTURA PARA A REAÇÃO DE PCR

A solução para a reação de PCR tem vários componentes:

- *PRIMER 1*
- *PRIMER 2*
- 10x PCR *Buffer*
- MgCl_2
- Taq DNA *Polymerase*
- dNTPs

Essa solução e o DNA extraído irá para o termociclador.

O volume total dessa solução é dado no artigo de referência. No artigo também estão as referências das concentrações e/ou volumes de cada um dos componentes. Então, muitas vezes os reagentes que o artigo sugere e os que possuímos no laboratório têm concentrações diferentes. Assim deve-se proceder o ajuste de nossos compostos, principalmente através da variação de volume de cada reagente empregado, para obtermos uma solução para a reação de PCR semelhante à sugerida pelo artigo. Comparando:

Para 30 μL (volume de uma amostra) o autor usou:

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

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

6pmol em 30µL, ou seja:

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

Na equação, $1 \text{ pmol}/1\mu\text{L} = 1\mu\text{M}$.

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

A concentração dos nossos *primers* é 5 µM.

Quanto se pegará do nosso *primer*, em µL, para mantermos a concentração sugerida pelo artigo?

$$M_{PRIMER} \times V_{PRIMER} = M_{ARTIGO} \times V_{ARTIGO}$$

$$5 \mu\text{M} \times V_{PRIMER} = 0,2 \mu\text{M} \times 30 \mu\text{L}$$

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

Vamos ter que pegar 1,2 µL de cada um de nossos *primers*.

Para as dNTPs

O autor usou 100 µM dNTPs em 30 µL.

Solução de Trabalho de dNTPs a 2,5 mM.

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

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

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

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

Para a TaqDNA Polymerase

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

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

O CLORETO DE MAGNÉSIO é opcional, mas ele favorece a reação. Das concentrações testadas, a que funcionou melhor foi 2 μL . Nunca usar mais cloreto de magnésio que solução de 10x PCR *Buffer*.

O VOLUME DE ÁGUA Milli-Q a ser adicionado é o que falta para completar os 30 μL sugeridos pelo artigo. Então, somam-se os volumes de todas as outras soluções e coloca a quantidade que falta para 30 μL .

PREPARO DA MISTURA PARA A SOLUÇÃO DE PCR

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

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

Em um *Eppendorf* de 200 μL , adicionar 29 μL de *Master Mix* + 1 μL da solução que contém o DNA bacteriano extraído.

Colocar as amostras no termociclador.

PREPARO DA AGAROSE

Para preparar o gel de agarose devemos saber o volume do suporte para o gel da cuba de eletroforese que iremos usar.

Misturar os seguintes componentes, para obter TBE 1x:

100 mL de TBE 10x + 900 mL de água destilada

Armazenar em um frasco para meio de cultura.

Esta solução será empregada para preparo da agarose e para preencher a cuba de eletroforese.

PREPARO DO GEL DE AGAROSE CONCENTRAÇÃO 1%

Gel de agarose (Ultra Pure TM Agarose – Invitrogen #16500-100) 100 g

Fechar bem a bandeja com os vedantes.

Bandeja Pequena (30 mL)

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

Bandeja Grande (100 mL)

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

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

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

Para um gel de 100 mL, colocamos 50 µL.

CUBA DE ELETROFORESE

1. A cuba está com TBE 1x.
2. Verificar a direção de corrida (NEGATIVO PARA POSITIVO)
3. Colocar o gel na cuba com os casulos voltados para o lado NEGATIVO.

4. Verificar se ele está coberto pela solução de TBE 1x.

PREENCHIMENTO DOS CASULOS COM A REAÇÃO DE PCR

1. SELEÇÃO DO MARCADOR

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

Misturar 3 µL do *Ladder* com 2 µL do *Loading Dye Solution* em parafilme.

Colocar esta mistura no primeiro casulo para que possam servir como controle.

2. COLOCAÇÃO DAS AMOSTRAS NA AGAROSE

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

3. FONTE DE ELETROFORESE

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



Figura 3. Isolamento do DNA bacteriano. A – QIAamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA), B – Centrífuga, C – Amostras em banho d'água, D – Filtro contendo membrana de sílica para retenção do DNA, E – DNA isolado. **Preparo da reação da PCR.** F, G, H – Reagentes utilizados para o preparo do *mix* da PCR: água Milli-Q estéril, dNTPs, Cloreto de magnésio, *buffer*, Taq DNA *polymerase*, *primers*, I – Placa de 96 poços ou microtubos (J) com as amostras distribuídas para receber o *mix*, L – Termociclador. **Visualização do produto da PCR.** M – Inserção das amostras nos poços do gel de agarose, N – Fonte de eletroforese, O – Transiluminador de luz ultravioleta, P – Visualização das bandas em gel de agarose através da eletroforese utilizando *primer* universal.

APÊNDICE 9

Teste *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)

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

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

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

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

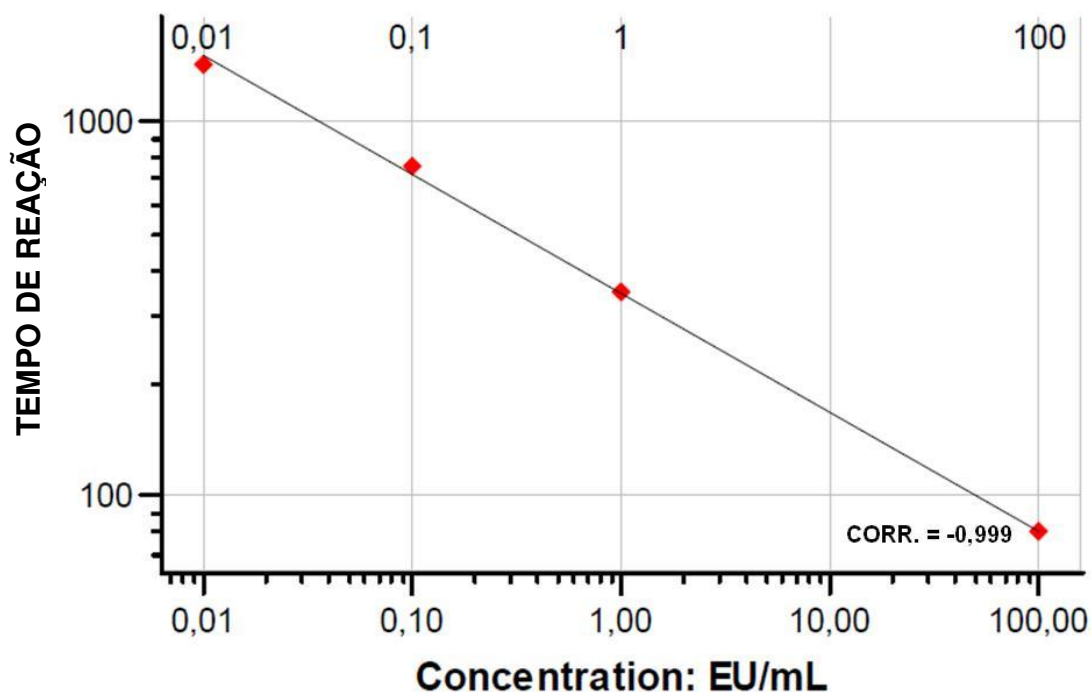


Gráfico 1. Curva padrão determinada a partir da diluição da solução de *E. coli* – utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxinas das amostras, com base na endotoxina da *E. coli* 055:B5 com concentração conhecida de 100 EU/mL.

8.1 Procedimentos para execução do teste

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

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

8.2 Cálculo da concentração de endotoxinas

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



Figura 4. Teste LAL Pyrogen-5000: **A** – Tubos de ensaio apirrogênicos para preparo da curva padrão, **B** – Endotoxina *E. coli* 055:B5, **C** – Reagente Pyrogen-5000 LAL, **D** – Tampão de reconstituição Pyrogen-5000 LAL, **E** – Água LAL reagente, **F** – Distribuição do reagente Pyrogen-5000 LAL reconstituído na microplaca de 96 poços, **G** – Leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA), **H** – Software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA (E-test)**1.1 Coleta das amostras**

1. Emprego de técnicas assépticas durante a terapia endodôntica e coleta das amostras.
2. Anestesia local.
3. Remoção dos contaminantes coronários.
4. Restauração de todas as vias de contaminação externa.
5. Isolamento absoluto do dente.
6. Descontaminação do campo operatório.
7. Evitar contaminação química do espaço pulpar.
8. Assegurar um acesso fácil para inserção do cone de papel no interior do canal radicular.
9. Coletar amostras eficientemente e efetivamente.

Após a colocação do isolamento absoluto, a descontaminação do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha e arco) (**Figura 5**) deve ser feita com solução de hipoclorito de sódio a 2,5 %. Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, realiza-se a neutralização do hipoclorito com o tiosulfato de sódio a 5%. Uma coleta microbiológica do campo operatório deve ser realizada para checar a eficácia do processo de descontaminação. Realiza-se a abertura coronária com o desligamento da água da caneta de alta rotação e auxílio de irrigação com soro fisiológico estéril e apirogênico. Antes da coleta da amostra, executa-se a remoção do material obturador com brocas de Gates Glidden e limas endodônticas, sem o uso de solventes químicos. Realiza-se uma tomada radiográfica para verificar a remoção do material obturador. A seguir, realiza-se uma irrigação do canal radicular com solução salina para remover qualquer resíduo do material obturador, e deixar o canal úmido para a coleta. Para a coleta de amostra bacteriológica do canal radicular, cones de papel absorvente estéril e apirogênico serão introduzidos no canal respeitando-se o comprimento de trabalho pré-estabelecido com auxílio do localizador apical, permanecendo

nesta posição por 60 segundos. O papel absorvente, ao ser retirado do canal, deve ser imediatamente introduzido em tubos contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGA III, o qual será transportado para o laboratório de Microbiologia. A coleta das amostras dos canais radiculares deve ser realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio.

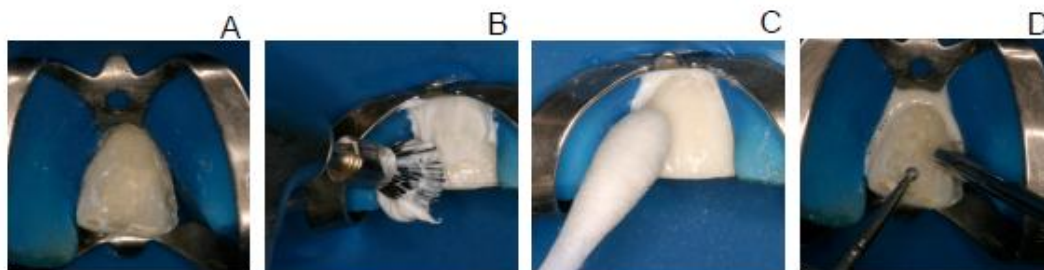


Figura 5. Sequência do protocolo de descontaminação. a) isolamento absoluto; b) vedamento da interface dente/lençol com super bonder ou top dam seguido de profilaxia com pedra pomes e água; c) descontaminação do campo operatório; d) abertura coronária com irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica.

1.2 Inoculação e Incubação

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP, dentro da cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford, Inglaterra), o tubo de Eppendorf contendo VMGA III e o cone de papel absorvente deve ser agitado (Agitador MA 162-MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) por 60 segundos. A seguir, realiza-se diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000 utilizando “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB - Lab M, Bury, Inglaterra), e inocula-se 50 µL de cada diluição, assim como da amostra não diluída, em placas pré-reduzidas contendo “Fastidious Anaerobe Agar” (FAA - Lab M, Bury, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro e FAA + 5% de sangue de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios, as quais serão incubadas em uma cabine de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento.

As mesmas diluições serão inoculadas em placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + BHI (Brain Heart Difusion) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para permitir o crescimento de anaeróbios facultativos e aeróbios.

1.3 Isolamento e identificação microbiana

Examina-se as placas com crescimento bacteriano em lupa estereoscópica (LAMBDA LET 2, ATTO INSTRUMENTS CO., Hong Kong) em aumento de 3 vezes, e as colônias serão CONTADAS e DIFERENCIADAS de acordo com as suas características macroscópicas na placa, observando tamanho, cor, forma, textura, elevação, opacidade e hemólise. Isolam-se as colônias bacterianas em 2 placas contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando uma placa na estufa de O₂ e uma na câmara de anaerobiose, e observando em qual condição gasosa haverá o crescimento bacteriano. As culturas puras, após serem testadas quanto ao requerimento gasoso, serão coradas pelo método do Gram e testadas quanto à produção de catalase. Será investigada a presença de *Enterococcus faecalis* pelo método bioquímico:

- **API 20 Strep (Figura 6)** (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa).



Figura 6. Api 20 strep - *Enterococcus faecalis*

1.4 E-TEST

Materiais necessários:

Preparo da cepa de *Enterococcus faecalis*:

- Cepa de *Enterococcus faecalis*. Lembrar-se de realizar o plaqueamento 24h antes
- Fluxo laminar e bico de bunsen
- Agitador
- Pipeta
- Ponteiras de 200 µL (amarela) estéreis
- Meio de cultura BHI sangue – balança, frasco de sangue de carneiro, frasco de vidro, água milli-Q, autoclave, banho maria, placa de petri, fluxo laminar, bico de bunsen, bancada, álcool 70
- Alça estéril
- Estufa

Antes do dia do experimento:

- Tubos de ensaio com tampa
- Pipetador automático
- Caldo FAB – balança, água milli-Q, frasco de vidro, autoclave
- Ponta de 10 mL ou 20 mL
- 5 mL de FAB estéreis em tubos de ensaio – autoclave, suporte para os tubos de ensaio
- Mueller-Hinton ágar – frasco de vidro, água milli-Q, balança, autoclave, placas de petri, banho maria, fluxo laminar, bico de bunsen, bancada, álcool 70

Inserção da fita de E-test:

- Meios FAB estéreis
- Cepa de *E. faecalis*
- Alça estéril
- Espectrofotômetro – ligar antes e calibrar

- Agitador
- Fluxo laminar e bico de bunsen
- Gaze estéril
- Fitas de antibióticos e retirados 20 min antes da geladeira
- Pinças estéreis
- Alcool para realizar a flambagem das pinças caso necessário
- Swab estéril
- Meio Mueller-Hinton
- Suporte para guardar as placas de petri
- Caneta marcadora
- Estufa

Leitura do teste:

- Imprimir uma tabela para inserir os resultados
- Caneta
- Fotografar
- Autoclavar as placas para realizar o descarte

Cepas de *Enterococcus faecalis* serão testadas quanto sua suscetibilidade/resistência através do método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia). Geralmente, os agentes antimicrobianos testados são: benzilpenicilina (PG), amoxicilina (AC), amoxicilina + ácido clavulânico (XL), eritromicina (EM), azitromicina (AZ), vancomicina (VA), cloranfenicol (CL), tetraciclina (TC), doxiciclina (DC), moxifloxacina (MX), ciprofloxacina (CI) e rifampicina (RI). O sistema do E-test consiste em uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 3 mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita do E-test pode detectar uma CIM que varia de 0,016 a 256 µg/mL, com um total de 29 diferentes concentrações, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993).

Para preparar o inóculo, após 24 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue, as colônias bacterianas serão transferidas para o meio líquido “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB - Lab M, Bury, Inglaterra) e agitadas, para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil), verificado no espectofotômetro (FEMTO 432, MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 800 nm.

Placas contendo 4 mm de espessura de Mueller-Hinton ágar serão utilizadas para o repique das cepas. A semeadura deve ser 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, previamente removidas do congelador e deixadas a temperatura ambiente cerca de 20 minutos, serão distribuídas nas placas com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada. O experimento será executado em duplicata e sempre em fluxo laminar.

As placas serão incubadas em condições aeróbicas (estufa de CO₂, a 37°C), e a leitura realizada após 16-20 horas. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) serão determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento. O valor de CIM₅₀ e CIM₉₀ correspondem às concentrações inibitórias mínimas para 50% e 90% dos isolados, respectivamente. De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do *E-test* em diferentes categorias de sensibilidade será realizada seguindo o guia de interpretação da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (Tabela abaixo).

Valores interpretativos de pontos de corte equivalentes das concentrações inibitórias mínimas - CIM ($\mu\text{g/ml}$) dos antimicrobianos avaliados nos testes de *Enterococcus* spp. (NCCLS- M100 S15)

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Resistente
Benzilpenicilina (PG)	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina (AC)	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina + ácido clavulânico (XL)	≤ 8	≥ 16
Eritromicina (EM)	$\leq 0,5$	≥ 8
Azitromicina (AZ)	≤ 2	≥ 8
Vancomicina (VA)	≤ 4	≥ 32
Cloranfenicol (CL)	≤ 8	≥ 32
Tetraciclina (TC)	≤ 4	≥ 16
Doxiciclina (DC)	≤ 4	≥ 16
Moxifloxacina (MX)	≤ 2	≥ 8
Ciprofloxacina (CI)	≤ 1	≥ 4
Rifampicina (RI)	≤ 1	≥ 4

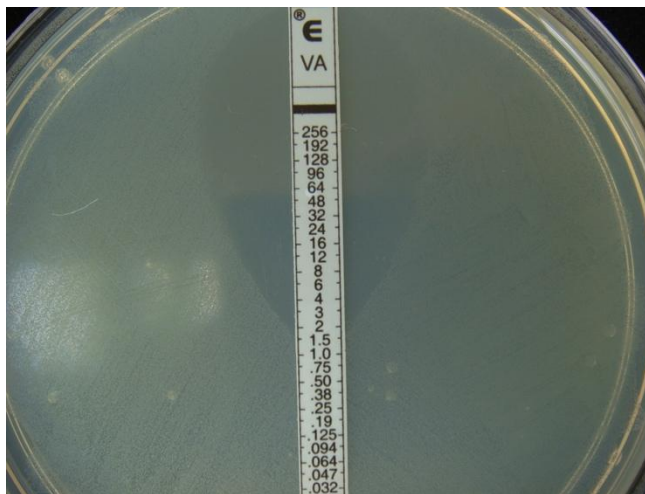


Figura 7. Halo de inibição em forma de elipse: cepa de *E. faecalis* frente à Vancomicina (VA) com CIM = 1,5 $\mu\text{g/mL}$



Figura 8. Halo de inibição em forma de elipse: cepa de *E. faecalis* frente à Amoxicilina (AC) com CIM = 0,25 $\mu\text{g/mL}$

FATORES DE VIRULÊNCIA

Materiais necessários:

- Caixa de tubos de eppendorf 1,5 mL e suporte
- Caixa de microtubos 0,5 mL e suporte
- Ponteiras 0,5-10 µL e pipeta
- Ponteiras 20-200 µL e pipeta
- Ponteiras de 1000 µL e pipeta
- Kit de extração (QIAamp DNA mini kit), álcool 100%, centrífuga, termoblock, banho maria, isopor
- Buffer
- Água DNA free
- MgCl₂
- DNTPs
- Taq platinum
- Primers e termociclador
- TBE- água milli-Q, proveta de 1000 mL(diluição)
- Agarose – balança, microondas, cuba, eletroforese, pentes, documentador de imagens/luz ultravioleta
- Brometo de Etídeo – frasco para uso único do produto
- Ladder 100 bp
- Loading e parafilm

1.1 Extração do DNA bacteriano de *Enterococcus faecalis*

A extração do DNA será realizado com o QIAamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Quinhentos microlitros de cada amostra de *E.faecalis* do canal radicular de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical serão utilizados para extração do DNA, o QIAamp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA).



Figura 9. Kit de extração

Apenas as amostras positivas para a espécie de *E. faecalis* serão utilizadas para o estudo dos determinantes virulentos.

O DNA será extraído utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir:

1. 500 µl das amostras de *E. faecalis* foram armazenadas em microtubos identificados.
2. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos.



Figura 10. Centrífuga

3. Remover o sobrenadante.
4. Adicionar 180µl de ATL (1) e 20µL de proteinase K (2).
5. Incubar a 56°C por 30 minutos.



Figura 11. Termoblock

6. Adicionar 200µL de AL (3) e novamente incubar a 70°C por 10 minutos.



Figura 12. Banho maria

7. Adicionar 200µL de etanol 100% e transferir todo volume para tubos com filtro (QL Amp Mini Spin Collum).
8. Centrifugar os tubos a 8000 rpm por 1 minuto.
9. O filtro será transferido para outro tubo vazio do kit.
10. Adicionar 500µl de AW1 (4).
11. Novamente centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
12. O mesmo processo será realizado para a adição de 500µl de AW2 (5).
13. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos.
14. Os filtros serão transferidos para eppendorfs de 1,5 mL com tampa.
15. Adicionar 100µL de solução AE (6).
16. Aguardar 3 minutos para nova centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto.
17. DNA das amostras será conservado em freezer - 20°C para posterior processamento.

1.2 Reação de PCR utilizando *primers* de determinantes virulentos e gel eletroforese

Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para detecção de determinantes virulentos em cepas de *E. faecalis* previamente isoladas*.

Genes	Pares de primers (5'-3')	Comprimento do fragmento amplificado em pb (pares de base)
<i>ace</i>	GGA ATG ACC GAGAAC GAT GGC GCT TGA TGT TGG CCT GCT TCC G	616
<i>efaA</i>	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTCCTTCTTTGGC	688
<i>asa</i>	CCA GCC AAC TAT GGC GGA ATC CCT GTC GCA AGA TCG ACTGTA	529
<i>asa373</i>	GGACGCACGTACACAAAGCTAC CTGGGTGTGATTCCGCTGTTA	619
<i>cylA</i>	GAC TCG GGG ATT GAT AGG C GCT GCT AAA GCT GCG CTT AC	688
<i>esp</i>	TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG A	933
<i>gelE</i>	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	405

*De acordo com Sedgley *et al.* (2005)

Serão utilizadas alíquotas de 1,5 µL do DNA isolado (aproximadamente 75 ng) de cada amostra clínica. Essas reações serão realizadas em um volume total de 25 µL, contendo:

- 0,25 µL de cada *primer* (100µM)
- 2,5 µL da solução tampão (10X *Taq buffer*, Invitrogen, Brasil)
- 2 mM de (1,25µL) de MgCl₂
- 0,2 mM (0,5µL) de cada dNTPs (Invitrogen)
- 0,125µL DNA *polymerase Taq Platinum* (5 U/µl, Invitrogen)
- 18,6 µl água Milli-Q

Os *primers* específicos e a provável amplificação dos genes relacionados aos fatores de virulência (número de pares de base – pb) estão citados na ***Tabela acima***. As sequências de oligonucleotídeos foram previamente descritas por Sedgley *et al.* (2005), são estes: substância de agregação (*asa* e *asa373*); antígeno da endocardite (*EfaA*); adesinas de superfície ou fator de aderência (*ace* e *esp*); ativador de citosina (*cylA*) e *gelatinase* (*gelE*).

Será utilizado um aparelho de termociclagem Biocycler (Biometra, Gottingen, Alemanha) para a amplificação do DNA, seguindo o protocolo de temperatura descrito por Sedgley *et al.* (2005), a seguir: 95°C por 2 minutos (temperatura inicial de desnaturação); 35 ciclos [94°C por 20s, 58°C por 45s (anelamento), 72°C por 1 minuto] e 72°C por 2 minutos (extensão final).



Figura 13. Termociclador

Os produtos das reações de PCR serão analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo adicionados diretamente no gel, e visualizados sob luz ultravioleta (UV). As reações serão consideradas positivas na presença de bandas de tamanho molecular apropriado. Serão utilizados marcadores moleculares de 100 pb (pares de base).



Figura 14. Eletroforese em gel de agarose

APÊNDICE 12

Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 30 pacientes com dentes indicados ao retratamento endodôntico.

	Idade	Gênero	Dente	Dor			Coroa	Qualidade restauração	Qualidade obturação do canal radicular	Tempo do tratamento endodôntico anterior (anos)	Tamanho da lesão (mm)	Identificação <i>E. faecalis</i>		
				Percussão	Palpação	Prévia						Cultura	PCR	nested PCR
1	44	F	21	+	+	+	Restaurada	Ruim	Boa	2	6	-	-	+
2	45	M	12	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	30	12,5	-	+	+
3	45	F	11	-	+	-	Restaurada	Ruim	Ruim	10	11,5	-	-	+
4	19	F	11	+	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	6	2	-	-	+
5	43	F	15	+	+	-	Restaurada	Ruim	Boa	3	4	-	-	-
6	44	M	45	+	-	-	Restaurada	Ruim	Boa	10	6	-	-	-
7	65	M	23	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	2	8	-	-	+
8	51	F	21	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	10	3,5	+	+	+
9	38	M	22	-	+	-	Restaurada	Ruim	Ruim	15	6	-	-	+
10	51	F	11	-	-	-	Restaurada	Ruim	Boa	10	2	-	+	+
11	40	F	12	+	+	-	Restaurada	Ruim	Ruim	6	4	-	-	+
12	32	F	22	+	+	+	Prótese provisória	Ruim	Ruim	20	3	+	+	+
13	41	F	12	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	2	2	-	-	+
14	53	F	22	-	+	-	Restaurada	Ruim	Ruim	20	3,5	+	+	+
15	43	F	43	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	7	3	-	+	+
16	27	M	11	-	-	-	Restaurada	Ruim	Boa	14	4	-	-	+
17	46	F	11	-	-	-	Prótese fixa	Ruim	Ruim	14	4	-	-	+

Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 30 pacientes com dentes indicados ao retratamento endodôntico Dados clínico e microbiológicos dos canais radiculares de 30 pacientes com dentes indicados ao retratamento endodôntico. (Continuação).

	Idade	Gênero	Dente	Dor			Coroa	Qualidade restauração	Qualidade obturação do canal radicular	Tempo do tratamento endodôntico anterior (anos)	Tamanho da lesão (mm)	Identificação <i>E. faecalis</i>		
				Percussão	Palpação	Prévia						Cultura	PCR	nested PCR
18	28	F	11	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	15	3,5	-	+	+
19	28	F	21	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	15	4	+	+	+
20	52	F	14	-	-	-	Restaurada	Boa	Ruim	30	2	-	+	+
21	38	F	22	-	+	-	Prótese fixa	Ruim	Ruim	5	2	+	+	+
22	30	F	22	-	-	-	Restaurada	Boa	Boa	8	4	-	-	-
23	37	F	15	+	-	-	Prótese fixa	Boa	Ruim	14	3	-	+	+
24	52	F	21	+	+	-	Restaurada	Boa	Boa	15	2	-	-	+
25	65	M	25	+	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	20	2	+	+	+
26	48	F	21	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	10	2	+	+	+
27	32	F	22	+	+	-	Prótese fixa	Ruim	Ruim	20	3	-	-	-
28	53	F	22	-	+	-	Restaurada	Ruim	Ruim	20	3,5	-	-	-
29	51	F	21	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	10	3,5	-	-	-
30	41	F	12	-	-	-	Restaurada	Ruim	Ruim	5	2	-	-	-

APÊNDICE 13

Fatores de virulência de colônias de *Enterococcus faecalis* isoladas do canal radicular de dentes submetidos ao retratamento endodôntico.

	Fatores de virulência						
	<i>ace</i>	<i>efaA</i>	<i>gelE</i>	<i>asa</i>	<i>esp</i>	<i>cylA</i>	<i>asa 373</i>
<i>Ef1</i>	+	+	-	+	-	+	-
<i>Ef2</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ef3</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>Ef4</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Ef5</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ef6</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Ef7</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ef8</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ef9</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ef10</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ef11</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>Ef12</i>	+	+	+	+	+	-	-

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO ALUNO

1. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BPFA, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod.* 2011; 37(12): 1696-700.
2. Endo MS, Soares AJ, Souza-Filho. Análise das alterações no forame apical após instrumentação com patencia e ampliação foraminal. *Rev EAP/APCD.* 2011; 65: 145-51.
3. Pinheiro ET, Penas PP, Endo M, Gomes BP, Mayer MP. Capsule locus polymorphism among distinct lineages of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *J Endod.* 2012; 38(1): 58-61.
4. Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BPFA. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(10): 2575-83.
5. Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary infection. *J Endod.* 2012; 38(8): 1082-6.
6. Matsumoto SN, Endo MS, Terada RSS, Lolli LF, Hayacibara MF. Features of selective examinations for dentists in Brazil. *RGO.* 2012; 60: 233-40.
7. Endo MS, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection

monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent. Aceito.*

8. Penas PP, Mayer MP, Gomes BP, Endo MS, Pinheiro ET. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. *J Endod. Aceito.*
9. Kurihara E, Neves VJ, Kitayama VS, Endo MS, Terada RSS, Marcondes FK. Relação entre saúde bucal e fatores psicológicos em idosos institucionalizados e não institucionalizados. *RGO. Aceito.*
10. Endo MS, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Polymerase chain reaction of 14 microorganisms and quantification of DNA during endodontic retreatment sessions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Submetido.*
11. Endo MS, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Efficacy of hand files and Mtwo R system for reducing intra-canal bacteria in root-filled teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Investig Clin Dent. Submetido.*
12. Martinho FC, Endo MS, Souza JAC, Nogueira AVB, Cirelli JA, Gomes BPF. Comparison of the antigenic activity of *F. Nucleatum* and *P. gingivalis* lipopolysaccharides clinically isolated from root canal infection against macrophages by levels of IL-1 β and TNF- α . *J Endod. Submetido.*

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



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



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Avaliação in vivo do efeito do preparo químico-mecânico sobre microrganismos e endotoxinas em infecções endodônticas persistentes e suscetibilidade antimicrobiana dos Enterococcus spp. isolados"**, protocolo nº 020/2011, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Marcos Sergio Endo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 28/04/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"In vivo study of effect of chemo-mechanical preparation of microorganisms and endotoxins from persistent endodontic infections and antimicrobial susceptibility of Enterococcus spp. isolated"**, register number 020/2011, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes and Marcos Sergio Endo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 04/28/2011.


Prof. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP


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

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.