



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



MARAISA GREGGIO DELBONI

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

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

Co-orientadora: Profa. Dra. Morgana Eli Vianna

PIRACICABA

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

D376i Delboni, Maraisa Greggio.
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. / Maraisa Greggio Delboni. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Morgana Eli Vianna.

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

1. Endodontia. 2. Microbiologia. 3. Antibióticos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Vianna, Morgana Eli. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Identification of microorganisms present in saliva, crown and root canal of endodontically treated teeth and analysis of antimicrobial susceptibility, virulence factors and diversity of clonal types of *Enterococcus faecalis* isolated

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Endodontics. 2. Microbiology. 3. Antibiotics

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Carlos Eduardo da Silveira Bueno, Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira, José Flávio Affonso de Almeida, Éricka Tavares Pinheiro

Data da Defesa: 24-04-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 24 de Abril de 2009, considerou a candidata MARAISA GREGGIO DELBONI aprovada.

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA BUENO

PROFa. DRa. FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE FERREIRA

PROF. DR. JOSÉ FLÁVIO AFFONSO DE ALMEIDA

PROFa. DRa. ERICKA TAVARES PINHEIRO

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, cuja proteção me permitiu a realização deste trabalho.

À minha família, **Toninho e Elaine, Gustavo, Andréia, Pedro, Gabriel e Beatriz, Luciano, Suelen e Arthur, Vó Maria e Tio Ailton, Tio Everaldo, Tia Luly, Nádia e Everalzinho**, pelo incentivo.

Ao meu marido **Fabrcício** pelo amor e compreensão em todos os momentos.

À **Profª. Drª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, minha amiga e orientadora, minha gratidão pelos momentos de orientação deste trabalho e de descontração em nossas inúmeras viagens, pela compreensão e pelo constante apoio em minhas conquistas.

À **Profª. Drª. Morgana Eli Vianna**, minha amiga e co-orientadora, pela amizade e pelos ensinamentos das novas metodologias.

Ao **Prof. Dr. David Drake**, pela oportunidade de fazer estágio na Faculdade de Odontologia da Universidade de IOWA, nos Estados Unidos, durante 6 meses e aprender técnicas moleculares em seu Laboratório de Microbiologia.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silveira Bueno**, meu primeiro mestre de Endodontia que até hoje se faz presente me incentivando mesmo de longe e à sua equipe EEC que pra mim serve de exemplo de responsabilidade em ensinar e sucesso profissional.

Aos professores de Endodontia da FOP-UNICAMP, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Profa, Dra. Brenda P F A Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof. Dr. Luiz Valdrighi**, pelos ensinamentos.

À banca de qualificação **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof. Dr. Rogério Castilho Jacinto** pelas sugestões e correções da minha tese.

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

Às amigas de doutorado **Morgana Eli Vianna e Vanessa Bellocchio Berber** pelas orientações, pela grande amizade e pelos ensinamentos em pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação **Danna Moreira, Ana Carolina Lima, Noboru Imura, José Roberto Berger, Ricardo Ferreira, Luciano Cintra, Thaís Accorsi, Juliana Santos, Helena Rabang, Flaviana Bombarda, Cícero Gadê Neto, Tétis Sauaia, Cecília Pereira, Priscila Nogueira, Giselle Cruz Abi Rached, Francisco Montagner, Frederico Martinho, Nilton Vivacqua Gomes, Gabriel Rocha, Karine Shell, Fábio Dametto, Rogério de Castilho, Daniel Pinto de Oliveira, Neylla Sena.**

Aos colegas de pós-graduação de todas as áreas de concentração, pelo convívio e aprendizado. Guardo, com carinho, em minha memória, todos vocês, pois foi muito bom conviver com a diversidade de cultura e áreas de conhecimentos. A todos um grande abraço.

À estagiária **Geovânia Almeida**, pela atenção e ajuda.

Aos funcionários **Wanderly Almeida, Rubens Payão, Adailton Lima, Denize de Pinho**, pela amizade e auxílio.

Aos amigos americanos **Rebecca Bohde**, pelo auxílio e correções dos textos em inglês, ao **Fritz Bohde** seu esposo, que me acolheram durante o intercâmbio e agora durante a minha pós-graduação, aos parentes e vizinhos, **Anita e Monte Dean, Jim e Karla, Mike e Kathy, Darlene e Ped**, pela atenção durante o meu estágio em IOWA.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de IOWA, principalmente a assistente **Bonny Olson**, e demais colegas **Alissa Vilhaeur, Julie, Deepa, Min, Yan**.

Aos Professores de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de IOWA, **Dr Richard E. Walton, Dr Willian T. Jonhson, Dr. Anne E. Williamson e Dr Bruce C. Justman** pela oportunidade de assistir as aulas teóricas do curso de especialização em Endodontia.

Aos residentes de Endodontia da Universidade de IOWA, **Christofer, Luke e Joe Vela** pela ajuda.

Aos brasileiros que vivem em IOWA, **Deise e Cristiano, Saulo e Gisele, Rodrigo e Clarissa, Bruno e Fabiana, Gustavo e Karine**, entre outros que juntos transformavam Iowa City numa cidade mais feliz.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Enfim, a **todos** que de alguma forma participaram da minha vida neste período.

RESUMO

Este estudo teve como objetivos: (a) identificar microrganismos resistentes, como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias na saliva de pacientes que apresentavam insucesso do tratamento endodôntico, (b) identificar a microbiota do material restaurador e dos canais radiculares dos mesmos, (c) verificar a suscetibilidade antimicrobiana dos *Enterococcus faecalis* isolados, (d) verificar os fatores de virulência e o perfil genético dos *E. faecalis* nos diferentes sítios examinados. Foram selecionados 42 casos clínicos de insucesso endodôntico. Coletas microbiológicas foram realizadas durante o atendimento clínico. Técnicas anaeróbicas e testes bioquímicos comerciais foram utilizados para cultivar e identificar os microrganismos. Quatorze cepas de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares foram testadas quanto a suscetibilidade antimicrobiana através do método E-test. PCR (16S rRNA) foi utilizado para confirmar a identificação da espécie de *E. faecalis* isolados por cultura. Para os estudos de genotipagem foi realizada a extração do DNA de 74 amostras de *E. faecalis* com o Qiamp DNA Mini Kit. Fatores de virulência foram investigados através de *primers* específicos para detectar: os genes de substâncias de agregação (*asa* e *asa373*); adesinas de superfície e fatores de aderência (*ace* e *esp*); ativadores de citolisina (*cylA*) e gelatinase (*gelE*). A detecção das enzimas citolisina e gelatinase também foi realizada através de testes fenotípicos. Para o estudo da diversidade genética foi utilizado o método REP-PCR (primer ERIC) e o AP-PCR (primer RW3A). Na saliva os gêneros mais frequentemente identificados foram *Enterococcus* (62%), *Staphylococcus* (45%), *Candida* (21%) e enterobactérias (38%). A porcentagem dos gêneros bacterianos mais prevalentes nas coroas e canais radiculares foram respectivamente: *Staphylococcus* (31% e 43%), *Streptococcus* (50% e 33,3%), *Enterococcus* (28,6% e 33,3%), *Actinomyces* (23,8% e 31%) e *Gemella* (23,8% e 21,4%). Em relação a suscetibilidade antimicrobiana, 100% das cepas testadas (n=14) foram suscetíveis à amoxicilina + ácido clavulânico. As colônias de *E. faecalis* estudadas (n=74) foram positivas para a maioria dos determinantes virulentos testados. Sete diferentes genótipos (G) foram visualizados, tanto no REP-PCR como no método AP-PCR. Concluiu-se que *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram identificados por cultura na saliva, na coroa e nos canais radiculares. O antibiótico mais efetivo foi amoxicilina + ácido clavulânico. Todas as cepas estudadas apresentaram fatores

de aderência e gelatinase. Além disso, foi observada similaridade no genótipo das múltiplas colônias de *E. faecalis*.

Palavras-chave: endodontia, microbiologia, *Enterococcus faecalis*, antibióticos, fatores de virulência, PCR, REP-PCR.

ABSTRACT

The aims of this study were: (a) to identify *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. and enterobacteria in saliva of patients with failure of the endodontically-treated teeth, (b) to investigate the microbiota in the restorative material and within root canals of the same subjects, (c) to determine the antimicrobial susceptibility of *E. faecalis* strains isolated from the root canals, (d) to study the *E. faecalis* virulence factors, and (e) to determine the similarity of the *E. faecalis* genotypes from different oral sites samplings. Forty-two cases of endodontic failure were selected. Samples were collected during the endodontic procedures. Anaerobic techniques and commercial kits were used to culture and identify the microorganisms. E-test System was conducted to test the antimicrobial susceptibility of the *E. faecalis* isolates (n=14). PCR (16S rRNA) was used to confirm the presence of *E. faecalis* isolated from the saliva, restorative materials and root canals. The genotypic studies involved DNA extractions of 74 *E. faecalis* strains using Qiamp DNA Mini Kit. Afterwards, the virulence factors were also verified using specific *primers* to detect: aggregation substances (*asa* e *asa373*), adherence factors (*ace* e *esp*), cytolysin activator (*cylA*) and gelatinase (*gelE*). Phenotypic tests were also used for production of gelatinase and cytolysin. Afterwards, the REP-PCR and AP-PCR were processed to determine the genome impression. *Enterococcus* spp. (62%), *Staphylococcus* spp. (45%), *Candida* spp. (21%) and enterobacteria (38%) were detected in saliva. The most prevalent genera identified in crowns and root canals were: *Staphylococcus* (31%, 43%), *Streptococcus* (50%, 33%), *Enterococcus* (28.6%, 33.3%), *Actinomyces* (23.8%, 31%) and *Gemella* (23.8%, 21.4%), respectively. *E. faecalis* were 100% susceptible to amoxicillin + clavulanate. The *E. faecalis* strains tested (n=74) expressed most of the potential virulence factors investigated. Homogeneous *E. faecalis* genotypes were observed in different subjects and particularly in multiple colonies isolated from each sampling site. Seven different genotypes (G) were identified using REP-PCR and 7 among the 74 *E. faecalis* strains using AP-PCR. In conclusion, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. and enterobacteria could also be detected in the saliva and in the root canals. The effective antibiotic for *E. faecalis* was amoxicillin combined with clavulanate. Adherence factors (*ace*) and gelatinase (*gelE*) were expressed in 100% of the *E. faecalis*. Furthermore, multiple *E. faecalis* showed similarity between genotypes of the same sites and subjects.

Key words: endodontics, microbiology, *Enterococcus faecalis*, antibiotics, virulent factors, PCR, REP-PCR.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	7
	Índice de sucesso do tratamento e do retratamento endodôntico	8
	Fatores associados ao insucesso endodôntico	10
	Microorganismos relacionados às infecções endodônticas persistentes	14
	<i>Enterococcus faecalis</i>	20
	<i>Staphylococcus</i> spp.	23
	<i>Propionibacterium e Actinomyces</i>	24
	Enterobactérias	24
	Fungos	26
	Infecção extra-radicular	27
	Infiltração coronária	29
	Microbiota da saliva / Ecossistema bucal	32
	Outros fatores associados ao insucesso endodôntico	34
	Tratamento do insucesso endodôntico	35
	O uso de antibióticos sistêmicos na endodontia	37
	<i>Penicilinas</i>	40
	<i>Macrolídeos</i>	43
	Testes de suscetibilidade antimicrobiana	45
	Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções endodônticas	47
	Métodos moleculares - PCR – Polimerase Chain Reaction	52
	Fatores de virulência microbiana	55
	Gelatinase (<i>gelE</i>)	56
	Substâncias de agregação (<i>asa</i> e <i>asa373</i>)	57
	Ativador de citolisinas (<i>cyIA</i>)	58
	Adesinas de superfície dos <i>Enterococcus</i> (<i>esp</i>)	59
	Adesinas de colágeno dos <i>Enterococcus</i> (<i>ace</i>)	59
	Fatores de virulência dos <i>E. faecalis</i>	60
	Diferenciação de <i>E. faecalis</i> através de AP-PCR e REP-PCR	61

3.	PROPOSIÇÃO	63
4.	MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1.	Coleta das amostras	67
4.2.	Identificação de microrganismos pelo método da cultura	69
4.2.1.	Morfologia colonial	70
4.2.2.	Requerimento gasoso microbiano	71
4.2.3.	Teste da coloração de <i>Gram</i>	72
4.2.4.	Teste da Catalase	72
4.2.5.	Teste da Oxidase	72
4.2.6.	Identificação das espécies através de Kits comerciais (BioMérieux)	73
4.3.	Teste de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> isoladas dos canais radiculares utilizando o método de cultura E-test (n=14)	74
4.4.	Detecção dos <i>Enterococcus faecalis</i> isolados da saliva, da coroa e canal radicular através de cultura e técnicas moleculares (n=74)	76
4.4.1.	Extração do DNA e reação de PCR utilizando <i>primers</i> de identificação e gel eletroforese	77
4.5.	Investigação dos fatores de virulência dos <i>Enterococcus faecalis</i> através de métodos de cultura e técnicas moleculares	80
4.5.1.	Extração do DNA e reação de PCR utilizando <i>primers</i> de determinates virulentos e gel eletroforese	80
4.5.2.	Atividade da Citolisina e Gelatinase	82
4.6.	Diferenciação das cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> utilizando DNA <i>fingerprinting</i>	83
4.6.1	Protocolo para extração de DNA (Universidade de Iowa – USA)	83
	Preparo das amostras de <i>E. faecalis</i> para a extração de DNA	83
	Extração do DNA utilizando protocolo do Master Mix Kit modificado	83
	Precipitação do DNA	84
4.6.2.	Protocolos das reações de REP-PCR utilizando <i>primers</i> ERIC1R, ERIC2 e de AP-PCR utilizando o <i>primer</i> RW3A	85
	Protocolo da Reação de REP-PCR	85
	Protocolo da Reação de AP-PCR	86

	Eletroforese	87
	Análise visual das imagens	87
4.7.	Análise estatística	88
5.	RESULTADOS	89
	Atividade Antimicrobiana	101
	Fatores de virulência	103
	REP-PCR	107
	AP-PCR	108
6.	DISCUSSÃO	113
	Microorganismos isolados da saliva da coroa e dos canais radiculares	113
	Suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>E.faecalis</i> isoladas (n=14)	119
	Fatores de Virulência das cepas de <i>E.faecalis</i> isoladas (n=74)	122
	Diferenciação das cepas de <i>E.faecalis</i> isoladas (n=74)	124
7.	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	129
	ANEXOS	
I	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	145
II	Certificado do comitê de ética	149
	APÊNDICES	
I	Meios de cultura	151
II	Câmara de anaerobiose	155
III	Protocolos de temperatura pra PCR	157
IV	Gel Eletroforese	161
V	Confirmação dos resultados do método PCR	163
VI	Estudo piloto de cepas de <i>E. faecalis</i> controle utilizando os métodos moleculares	171

1. INTRODUÇÃO

O insucesso do tratamento endodôntico está associado ao aparecimento ou à 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). Portanto 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).

A maioria dos casos de fracasso do tratamento endodôntico ocorre devido a procedimentos clínicos insatisfatórios e a dificuldade de eliminação da infecção (Nair *et al.* 1999). Assim, o insucesso pode estar relacionado com canais não detectados, portanto não tratados, falhas na instrumentação, falta de controle asséptico durante o tratamento, acidentes ocorridos durante o acesso à câmara pulpar e/ou durante a instrumentação do canal radicular, obturações e restaurações inadequadas do dente que sofreu intervenção endodôntica.

Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem sobreviver, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares (Ida & Gutmann, 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários, reabsorções apicais externas, podem não ser afetadas pelas medidas usadas na desinfecção endodôntica (Nair, 1987; Nair *et al.*, 1990a, 1999).

Os microrganismos, sendo estes, os resistentes ao tratamento endodôntico ou os que contaminam o canal após o tratamento endodôntico através das infiltrações coronárias, são apontados na literatura como os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico (Malooley *et al.*, 1979; Pitt Ford, 1982; Lin *et al.*, 1991, 1992; Dahlén & Mölller, 1992; Cheung, 1996; Siqueira Jr & Lopes, 1999). A falta de uma restauração coronária satisfatória promove uma fonte constante de agentes infecciosos que podem iniciar e manter a infecção periapical contribuindo com o insucesso endodôntico (Saunders & Saunders, 1994).

Portanto, há necessidade de estudos comparando a microbiota do canal radicular de dentes com insucesso endodôntico com a saliva do mesmo paciente, relacionando fatores

clínicos e radiográficos e investigando a possibilidade de uma verdadeira infiltração coronária ou contaminação externa no trans-operatório.

Allen *et al.* (1989) e Hepworth & Friedman (1997), analisando o sucesso do retratamento endodôntico, encontraram uma taxa de aproximadamente 66%. Esse índice se apresenta modesto quando comparado com a alta taxa de sucesso do tratamento endodôntico - 85% a 96% (Swatz *et al.*, 1983; Sjögren *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993).

O menor índice de sucesso do retratamento endodôntico pode indicar, além de dificuldades técnicas, devido a fatores iatrogênicos do tratamento anterior, uma dificuldade na eliminação da microbiota mais resistente presente nos dentes com insucessos do tratamento endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). Um estudo criterioso das bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico e de sua suscetibilidade à terapia endodôntica poderia nos levar a um progresso das técnicas de desinfecção endodôntica e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento.

Estudos sobre a natureza das infecções dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais têm aumentado nos últimos anos como podemos notar na literatura (Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Rolph *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2003a; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Adib *et al.*, 2004; Gorni & Gagliani 2004; Gomes *et al.* 2006, 2008; Roças *et al.* 2008; Siqueira & Rôças, 2008). Poucos estudos anteriores a 2000 (Möller, 1966; Gomes *et al.*, 1996c; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998) revelaram que a microbiota de canais radiculares de dentes com fracasso do tratamento endodôntico era diferente daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e não tratados endodonticamente.

A particularidade da microbiota encontrada nos canais com tratamento endodôntico prévio que fracassaram deve-se a um processo de seleção dependente da resistência específica de determinados microrganismos ao preparo químico-mecânico e à medicação intra-canal utilizada durante a terapia endodôntica, e da capacidade de sobrevivência em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas (Sundqvist *et al.*, 1998).

Debelian *et al.* (1995), estudando a bacteremia associada à terapia endodôntica, isolaram *Propionibacterium* e *Actinomyces* do canal radicular e do sangue dos pacientes

durante e após o tratamento endodôntico. Os referidos autores, em trabalho anterior (Debelian *et al.*, 1994) enfatizaram que microrganismos que entram na circulação sanguínea são geralmente eliminados pelo hospedeiro dentro de minutos; entretanto, em pacientes com disfunções de válvulas cardíacas ou doenças vasculares, a bacteremia pode ser um perigo potencial.

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 persistentes e acompanhar o padrão de sensibilidade dessas bactérias aos antibióticos (Abbott *et al.*, 1990) 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; Rosenblatt & Brook, 1993; Forbes *et al.*, 1998). 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.

Dados atuais revelam que cerca de 100 espécies/filotipos já foram detectados depois da instrumentação e/ou depois da medicação intra-canal, sendo que as bactérias gram-positivas são as mais dominantes (Siqueira & Rôças, 2008). Porém, são necessários estudos que determinam se alguma espécie/filotipo que persiste após o tratamento endodôntico pode realmente influenciar no sucesso. Afinal, existem diversos fatores responsáveis pela persistência de bactérias após a terapia endodôntica, como os fatores de virulência dos microorganismos, ou ainda, os requisitos que uma bactéria persistente precisa pra causar o insucesso.

O real papel dos *E. faecalis* na infecção secundária ainda não foi esclarecido pela literatura. Fabricius *et al.* (1982), mostraram que *E. faecalis* em monoinfecções sobreviveram por 6 meses quando inoculados em canais radiculares de macacos, embora no periápice tivesse apenas uma inflamação leve. Sugere-se que o *E. faecalis* pode estar sendo

selecionado durante a terapia endodôntica. Love (2001) relata que a habilidade que estes microrganismos têm de invadir os túbulos dentinários os protege do preparo-químico-mecânico e da medicação intra-canal. Subseqüentemente, quando oportuno ele volta a colonizar o canal principal, podendo originar a reinfecção. Se isso ocorre clinicamente, se faz necessária a investigação dos potenciais fatores de virulência para o conhecimento do papel que estes microrganismos desenvolvem a infecção persistente ou secundária. Os potenciais fatores de virulência incluem aqueles que promovem a adaptação e a sobrevivência destes microrganismos em diferentes ambientes, por exemplo, as proteínas de superfície (*esp*) e as substâncias de agregação (*asa*) e os fatores que favorecem a secreção de toxinas, citolisinas e proteases (gelatinase).

Fenótipos, descrição do biótipo, sorotipagem e padrões de suscetibilidade antimicrobiana foram muito utilizados para caracterizar espécies bacterianas. Recentemente os métodos moleculares tem sido utilizados para se avaliar diferenças genótípicas em células procariontes, onde a célula bacteriana pode ser avaliada através de seus padrões de DNA *fingerprint*. Os métodos REP e ERIC permitem uma diferenciação entre espécies bacterianas que contenham esses elementos repetitivos. A amplificação e o gel de eletroforese do produto de PCR geram o “DNA fingerprint” (perfil genético) de complexidade suficiente para a diferenciação de cepas.

Os métodos moleculares são utilizados atualmente na maioria das pesquisas como uma etapa fundamental, onde o DNA é investigado e pode esclarecer muitas características da biologia celular de cada microorganismo. Neste caso, a investigação dos *E. faecalis* isolados em diferentes sítios da cavidade oral, pode ser estudada através da observação do seu genótipo, apresentando uma grande importância para nosso estudo, como a busca da diferenciação entre os *Enterococcus faecalis*. Portanto, os métodos ERIC-PCR e AP-PCR foram selecionados para este estudo, para fazer a diferenciação das cepas de *E. faecalis* isoladas, no intuito de se conhecer a similaridade de uma mesma espécie originada de diferentes sítios, porém em um mesmo sujeito.

Razavi *et al.* (2007) sugere que os enterococcus são microorganismos transitórios do ecossistema oral saudável e se originam dos alimentos. Afinal são raramente detectados na cavidade oral de indivíduos saudáveis e continuam sendo associados aos canais endodonticamente tratados. Assim, a real origem dos enterococcus continua incerta.

Portanto, estudo busca identificar as características fenotípicas e genotípicas dos *Enterococcus faecalis* isolados da saliva, da coroa e do canal radicular para um esclarecimento sobre o surgimento ou persistência da reinfecção endodôntica, o que nos direcionaria em relação a prevenção ou ao combate desta reinfecção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Bactérias presentes no interior dos canais radiculares constituem os principais agentes etiológicos da inflamação periapical (Takehashi *et al.*, 1965; Möller *et al.*, 1981; Takahashi, 1998). Na maioria dos casos, o insucesso do tratamento endodôntico ocorre devido a procedimentos clínicos insatisfatórios de controle e eliminação da infecção (Nair *et al.*, 1999), como a falta de controle asséptico durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas, e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (Cheung, 1996).

Engström (1964) e Möller (1966) estudaram a microbiota de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais e relataram um crescimento bacteriano de 38% e 45,5% respectivamente, com predomínio de bactérias facultativas. Porém, até a década de 70, as técnicas de isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias eram deficientes.

As bactérias presentes nos canais de dentes tratados endodonticamente que fracassaram podem ser originalmente derivadas da infecção primária (Fukushima *et al.*, 1990; Sjögren *et al.* 1997), ou introduzidas no canal por procedimentos inadequados durante o tratamento endodôntico (Siren *et al.*, 1997), ou ainda, penetrarem no canal através de um selamento coronário inadequado (Cheung, 1996).

Crítérios clínicos e radiográficos de avaliação do sucesso ou fracasso endodôntico foram apresentados pela Associação Americana de Endodontia (QUALITY ASSURANCE GUIDELINES, 1987). Segundo esta associação, para avaliação clínica, os seguintes critérios subjetivos e objetivos devem ser usados: dor à palpação, mobilidade dentária, doença periodontal, fístula, sensibilidade à percussão, função do dente, sinais de infecção ou edema, e sintomas subjetivos. Assim, são considerados fracassos endodônticos, dentes que apresentam sintomas subjetivos persistentes, fístula recorrente ou edema, desconforto à palpação ou à percussão, evidência de uma fratura irreparável da unidade dentária, excessiva mobilidade ou perda periodontal progressiva, e inabilidade do dente exercer sua função. Os critérios radiográficos demonstram insucesso quando há: um aumento da espessura do ligamento periodontal, ausência do reparo ósseo no interior da lesão ou aumento do tamanho da rarefação, ausência da formação de uma nova lâmina dura, presença de rarefações ósseas em áreas onde previamente não existiam, espaços não-

obturados visíveis no canal, apicalmente ou lateralmente, e reabsorções ativas associadas a outros sinais radiográficos de insucesso.

Para resolução dos casos de insucesso existem duas modalidades de tratamento: o retratamento endodôntico e a cirurgia periapical. Estudos indicam o retratamento convencional como primeira opção de tratamento nos casos de insucesso (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997; Ruddle, 1997). Vale ressaltar que a realização do retratamento convencional, prévio a cirurgia periapical, aumenta o índice de sucesso da mesma (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997). Assim, considerando-se que o retratamento é uma intervenção de alta ocorrência e que apresenta índice de sucesso inferior ao da intervenção primária, torna-se importante uma rigorosa avaliação dos fatores que originaram tal fracasso, para que se possa planejar o tratamento mais adequado para o caso, entre eles: retratamento, novo retratamento, cirurgia parendodôntica, preservação, ou a associação das mesmas.

Peciulien *et al.* (2006) estudaram os fatores relacionados ao fracasso endodôntico e observaram que obturações inadequadas estão associadas com o aumento da prevalência de lesões periapicais. Ao contrário, canais com bom tratamento endodôntico reduz significativamente a prevalência destas alterações.

O tempo de preservação pós-tratamento endodôntico para determinar sucesso/insucesso varia entre os autores. Estudos têm indicado um período mínimo de 4 anos pós-tratamento endodôntico (Strindberg *et al.*, 1956; Engström *et al.*, 1964; Sjögren *et al.*, 1997; Estrela *et al.*, 2008), enquanto outros recomendam 2 anos (Bender *et al.*, 1966; Bergenholtz *et al.*, 1979), 1 ano e meio (Friedman *et al.*, 1995) e 1 ano (Reit, 1987).

Índice de sucesso do tratamento e do retratamento endodôntico

O tratamento endodôntico apresenta uma alta taxa de sucesso, mas a presença da lesão periapical, influencia no seu prognóstico. Swartz *et al.* (1983) analisaram o sucesso endodôntico de 1.007 dentes após 20 anos do tratamento endodôntico, e encontraram uma taxa de sucesso de 87,79%.

Sjögren *et al.* (1990), em uma avaliação clínico-radiográfica de 356 dentes após 8 a 10 anos do tratamento endodôntico, reportaram uma taxa de sucesso de 62% em casos de

retratamento endodôntico de dentes com lesões periapicais. Entretanto, verificaram um índice de sucesso do tratamento endodôntico em 86% dos dentes com polpa necrosada e lesão periapical, e em 96% dos dentes com polpas vitais e não-vitais sem lesão periapical.

Smith *et al.* (1993), em estudo retrospectivo analisaram dentes após 5 anos do tratamento endodôntico e encontraram um taxa de sucesso de 84,29%, representando 692 de 821. Friedman *et al.* (1995) verificaram um índice de sucesso de 97% em casos de dentes sem lesões periapicais, enquanto em dentes com lesões, o reparo estava presente em apenas 63,2% dos casos.

A menor taxa de sucesso do retratamento endodôntico, quando comparado ao tratamento endodôntico de polpas necrosadas, tem sido relacionada a dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos cometidos no tratamento endodôntico anterior (Lewis & Block, 1988).

Van Nieuwenhuysen *et al.* (1994) e Sundqvist *et al.* (1998) relataram um índice de sucesso de 78% e 74%, respectivamente, em casos de retratamentos endodônticos convencionais.

Molander *et al.* (1998) estudaram a microbiota existente em 100 dentes com canais obturados há mais de 4 anos, nos quais lesões periapicais denotavam insucesso do tratamento. Concluíram que a microbiota dos canais obturados diferia qualitativa e quantitativamente das polpas necróticas não tratadas. A predominância encontrada constituiu-se de espécies bacterianas anaeróbias facultativas (69% das amostras identificadas), onde a espécie mais freqüentemente isolada foi *Enterococcus faecalis*. Os autores ressaltaram que baixas taxas de sucesso podem indicar uma dificuldade na eliminação da microbiota presente nos dentes com tratamento endodôntico prévio, que representa um grupo limitado de microrganismos altamente resistentes à terapêutica do tratamento endodôntico. Os autores concluíram em seu estudo que as estratégias do retratamento convencional deveriam ser reconsideradas, e sugeriram que fossem realizados mais estudos sobre a microbiota de dentes tratados endodonticamente, sua composição e suscetibilidade a substâncias medicamentosas utilizadas no tratamento, com o objetivo de elevar os índices de sucesso.

Estrela *et al.* (2008) estudaram a prevalência e os fatores de risco das lesões periapicais em dentes tratados endodonticamente em adultos brasileiros selecionados. Foram analisadas 1372 radiografias periapicais observando a qualidade da obturação, a

qualidade da restauração coronária e a presença de pinos intra-radulares associados às lesões periapicais. A presença de lesões periapicais em dentes com tratamento endodôntico satisfatório foi baixa (16,5%). Esta porcentagem caiu ainda mais (12%) nos casos que apresentaram obturações e restaurações adequadas. Quando boas restaurações estavam associadas com obturações ruins as lesões apicais foram observadas em 62% dos casos.

Fatores associados ao insucesso endodôntico

Além dos problemas anatômicos, que consistem em áreas inacessíveis à instrumentação, o fracasso endodôntico pode advir da resistência de determinadas bactérias aos métodos químicos e mecânicos utilizados na terapia endodôntica convencional. Casos de acidentes, como desvios, degraus, perfurações, instrumentos fraturados e sobre-obturações, usualmente resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso (Siqueira Jr. & Lopes, 1999).

Sjögren *et al.* (1990) relataram que o nível da instrumentação e obturação dos canais radiculares apresentou uma influência significativa no prognóstico do tratamento endodôntico de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais, que apresentaram uma taxa de sucesso inferior aos dentes com polpas vitais. Os autores ressaltaram que fatores não identificados ou analisados no estudo, como a persistência de bactérias no sistema de canais radiculares, podem ser críticos no prognóstico de dentes tratados endodonticamente.

Lin *et al.* (1991) estudaram através de avaliação clínica, radiográfica e histobacteriológica 150 casos com insucesso do tratamento endodôntico, e detectaram bactérias em 69% dos dentes, presentes principalmente no interior dos canais radiculares, estando relacionadas com a severidade da infecção periapical.

De acordo com Dahlén & Möller (1992), as falhas do tratamento endodôntico não podem, por si só, causar ou manter a inflamação periapical. Entretanto, a obturação incompleta do canal radicular favorece a persistência de microrganismos e seus produtos em espaços vazios permitindo a permanência da infecção e conseqüentes danos aos tecidos periapicais. Além desse fator, uma obturação incompleta é resultante de uma instrumentação inadequada, o que proporciona a manutenção de tecidos necróticos e microrganismos no interior do sistema de canais radiculares.

Segundo Smith *et al.* (1993) o grau de sucesso do tratamento endodôntico é influenciado por fatores técnicos, como o nível da obturação na taxa de sucesso do tratamento endodôntico. Os autores encontraram que os canais com sobre-obturações e obturações incompletas apresentavam um maior índice de insucesso quando comparado com aqueles obturados a 2 mm do ápice radiográfico. Entretanto, esses fatores só foram determinantes de insucesso em canais com polpas necrosadas e lesões periapicais.

Gomes *et al.* (1996b) estudaram a suscetibilidade da microbiota dos canais radiculares ao preparo químico-mecânico, e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar todas as bactérias, apresentando algumas espécies mais resistentes do que outras, como por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Sjögren *et al.* (1997) estudaram a relação entre a presença de bactérias no canal radicular no momento da obturação e o sucesso do tratamento endodôntico em 55 dentes com periodontite apical. Após a realização das coletas microbiológicas, os canais foram obturados na mesma sessão, e foram preservados por um período de 5 anos. Os dentes com cultura negativa após a instrumentação apresentaram sucesso em 94% dos casos, enquanto nos dentes com cultura positiva, o sucesso era de apenas 68%. Os autores verificaram que 2 casos que resultaram em fracasso endodôntico, apresentavam *Actinomyces israelii* nos canais radiculares no momento da obturação. A análise histológica das lesões periapicais desses dentes revelou a presença dessa bactéria nos tecidos periapicais, caracterizando uma actinomicose periapical. Os autores ressaltaram que essas bactérias resistentes ao preparo químico-mecânico, se permanecerem viáveis, podem manter a inflamação periapical, sendo um importante fator no insucesso do tratamento endodôntico.

Gutiérrez *et al.* (1999), através da análise, em microscopia eletrônica de varredura, de dentes com lesões periapicais e limas endodônticas ultrapassando o ápice ou canais sobre-obturados, demonstraram a presença de bactérias nas espirais das limas que ultrapassavam o forame apical, e principalmente na superfície radicular ao redor do forame apical, aderidas nas lacunas de reabsorção radicular. No grupo controle, que consistia de dentes com polpas vitais, sobre-instrumentados e sobre-obturados, nenhuma bactéria foi detectada na superfície das limas, no ápice, ou no cone de guta-percha extruído além do ápice.

Gomes et al. (2000b) investigaram a microbiota em casos indicados para reintervenção endodôntica, dada a persistência de lesão periapical. Dos 28 dentes selecionados, 75% abrigavam contaminação no interior do canal radicular, sendo essa infecção constituída por 1 ou 2 espécies bacterianas. Os gêneros mais freqüentemente isolados foram *Streptococcus* (32,1%), *Enterococcus* (17,9%), *Peptostreptococcus* e *Actinomyces* (10,7%) e *Prevotella* (7,1%). Os autores concluíram que a microbiota dos canais de dentes categorizados como insucesso endodôntico foi representada, principalmente, por bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas.

Dahlén et al. (2000) examinaram a ocorrência de isolados após preparo químico-cirúrgico e avaliaram a sensibilidade antimicrobiana utilizando medicação intracanal entre sessões. Os pesquisadores identificaram o enterococcus em 79,3% em cultura pura, sendo 26 *Enterococcus faecalis* e 3 *Enterococcus faecium*. Os autores concluíram que a baixa sensibilidade dos enterococos aos agentes antimicrobianos poderia selecioná-los no interior dos canais radiculares e contribuir, significativamente, para o insucesso da terapia endodôntica.

Compreender a microbiota resistente ao tratamento endodôntico em dentes portadores de periodontite apical foi o objetivo da pesquisa de Chávez de Paz et al. (2003). Durante 10 meses, 200 dentes, que se encontravam em tratamento endodôntico, foram submetidos à análise microbiológica. Relataram a prevalência de bactérias Gram-positivas após o preparo químico-mecânico (85%), e a presença de outras espécies além dos *Enterococcus* spp., especialmente *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. Apesar do preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, anaeróbios facultativos Gram-positivos ainda puderam ser isolados na maioria daqueles canais radiculares, enquanto 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.

Algumas bactérias relacionadas às infecções endodônticas persistentes também foram encontradas após o preparo químico-mecânico, sendo *Enterococcus faecalis* freqüentemente isolados desses canais radiculares (Bender & Seltzer, 1952; Engström,

1964; Goldman & Pearson, 1969; Cavalleri *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1996b, Chávez de Paz, 2003; Siqueira & Rôças, 2008). Estudos também têm demonstrado a persistência de espécies de *Staphylococcus* spp. após a realização do preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Goldman & Pearson, 1969; Gomes *et al.*, 1996b).

Hommez & Moor (2005) encontraram uma maior incidência de lesões periapicais nos dentes tratados endodônticamente afirmando que fatores pré e pós operatórios podem ser os responsáveis por esta na prevalência. O isolamento absoluto do elemento dental, seguido da limpeza e modelagem do canal radicular durante a terapia endodôntica são procedimentos importantes que promovem a desinfecção trazendo a cura e previne o aparecimento de lesões periapicais. Resaltam ainda que uma boa obturação assim como uma boa restauração são importantes na prevenção da reinfecção dos canais radiculares.

Peciulien *et al.* (2006) investigaram a qualidade técnica da obturação, sua associação com as alterações periapicais e a prevalência de lesões periapicais. Foram examinados 83 pacientes nos anos 2005/2006. Foi observado em cada dente: a presença de material obturador, a qualidade da obturação e alterações periapicais. Dos 2186 dentes em função, 283 possuíam dentes com tratamento endodôntico (13%). Entre estas 283 endodontias, 122 dentes (43%) tinham sinais radiográficos de lesão periapical. Apenas 28,6% dos dentes apresentavam os critérios para uma endodontia satisfatória. Condensação lateral inadequada foi observada em 165 (58%) de 283 endodontias. Comprimento inadequado da obturação apical foi observado em 183 (64,7%). Dentes bem tratados que não apresentavam espaços na obturação e apresentavam lesões periapicais eram 25 (21%) dos 118 casos, onde os espaços eram detectados, a doença estava presente em 97 (58,8%) dos 165 dentes ($p < 0.001$). Lesões periapicais foram encontradas em 23 (23%) dos 100 dentes com comprimento da obturação adequado, mas se estivesse muito aquém ou com sobre obturação, lesões periapicais estavam presentes 99 (54%) dos 183 dentes ($p < 0.001$). Lesões periapicais estavam presentes em 43% dos dentes tratados endodônticamente. Apenas 28,6% possuíam tratamento adequado. Muitos tratamentos endodônticos estavam tecnicamente insatisfatórios por isso esforços devem ser feitos para uma melhoria do padrão da terapia endodôntica.

Estrela *et al.* (2008) estudaram os fatores de risco das lesões periapicais através da análise de radiografias periapicais. Dentes com tratamento endodôntico adequado e

restaurações inadequadas apresentaram uma prevalência de 28% de lesões periapicais. Lesões periapicais foram mais frequentemente observadas (71,7%) em dentes com restauração e tratamento endodôntico inadequado. A presença de pinos-intraradiculares não teve influência na prevalência de lesões periapicais.

Siqueira & Rôças (2008) reafirma que a periodontite apical é uma doença infecciosa causada por microorganismos que colonizam o sistema de canais radiculares. Para se alcançar o sucesso do tratamento endodôntico, as bactérias do interior dos canais radiculares devem ser eliminadas ou pelos menos significativamente reduzidas a níveis que favoreçam a cura dos tecidos periapicais. Se a bactéria persistir depois do preparo químico-mecânico, com ou sem o uso da medicação intra-canal, existe um risco de insucesso endodôntico. Por isso, a presença de microorganismos no momento da obturação mostrou ser um fator de risco para a periodontite apical após o tratamento endodôntico.

Microrganismos relacionados às infecções endodônticas persistentes

Microrganismos sobreviventes às medidas de desinfecção podem manter-se viáveis, dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis e da 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, 1995; Gomes *et al.*, 1996b; Lopes *et al.*, 1999).

Estudos recentes realizados pelo método de cultura (Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Adib *et al.*, 2004) mostraram que a microbiota de canais com insucesso do tratamento endodôntico difere daquela encontrada em dentes necrosados (Sundqvist, 1989, 1992a, b; Baumgartner, 1991; Baumgartner & Falker, 1991; Sato *et al.*, 1993; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996 (a,b,c), 2004; Baumgartner *et al.*, 1999), tanto quantitativamente quanto qualitativamente, sendo caracterizada por monoinfecções com predominância de bactérias anaeróbias facultativas.

O número de espécies bacterianas isoladas de casos de retratamento está provavelmente relacionado à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamentos endodônticos de má qualidade, isto é, dentes com obturações muito aquém do ápice ou com falhas, apresentam uma microbiota similar àquela encontrada nos dentes não-

tratados, os quais contêm um maior número de espécies bacterianas. (Sundqvist *et al.*, 1998)

O número limitado de microrganismos encontrados nos dentes tratados endodonticamente deve-se a fatores de seleção que determinam a persistência das bactérias capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos e medicamentos utilizados na terapia endodôntica, e de sobreviver em um meio escasso de nutrientes (Sundqvist *et al.*, 1998).

Geralmente as bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes à atividade antimicrobiana do que os anaeróbios, podendo persistir mais freqüentemente em canais radiculares após a terapia endodôntica. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa atividade metabólica por um período, e mudanças das condições ambientais, como uma infiltração coronária, pode ativar o seu crescimento (Molander *et al.*, 1998).

Engström (1964), investigando a presença de *Enterococcus* spp. nas infecções endodônticas, verificou que estavam presentes em 20,9% das amostras de dentes com tratamento endodôntico prévio, enquanto representavam 12,1% das amostras de polpas necrosadas. O autor ressaltou, em seu trabalho, a dificuldade em eliminar esses microrganismos dos canais radiculares, constituindo um problema na terapêutica endodôntica.

Möller (1966), realizando um estudo microbiológico de 654 canais radiculares de dentes com polpas vitais, polpas necróticas e com tratamento endodôntico prévio, relatou que a microbiota de dentes com fracasso da terapia endodôntica era composta por um número menor de microrganismos quando comparada aos dentes com polpas necróticas, apresentando uma média de 1,6 espécie bacteriana por canal. Dos 264 dentes com tratamento endodôntico prévio estudados, 120 (45,5%) apresentaram culturas positivas. O autor relatou que havia um equilíbrio entre as bactérias anaeróbias facultativas e estritas, com as últimas correspondendo a 51% do total das bactérias isoladas, e um predomínio de bactérias Gram-positivas, compreendendo 80% dos isolados. Espécies do gênero *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* e *Eubacterium*, foram isoladas freqüentemente; enquanto *Prevotella* e *Fusobacterium* foram menos freqüentes. *Enterococcus faecalis* foi isolado em 29% dos casos que apresentavam culturas positivas.

Nair *et al.* (1990a) detectaram a presença de bactérias e fungos nos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais persistentes. Os autores analisaram 9 dentes utilizando a microscopia óptica e eletrônica de transmissão, e verificaram a presença de microrganismos em 6 casos, 4 contendo bactérias e 2 contendo fungos. Os microrganismos foram detectados em deltas apicais e reabsorções radiculares, em canais laterais não obturados que apresentavam comunicação com o forame apical, nas lacunas de Howship das paredes dentinárias, e entre o material obturador e as paredes dentinárias dos canais radiculares. Os resultados sugeriram que a maioria dos dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais resistentes ao tratamento convencional, pode conter microrganismos persistentes, que podem desempenhar um papel significativo do fracasso do tratamento endodôntico.

Fukushima *et al.* (1990) estudaram as bactérias presentes em 21 dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais, assintomáticos, as quais eram consideradas lesões fechadas, por não apresentarem o canal radicular exposto ao meio bucal. Foram utilizados 21 dentes extraídos. Após a extração, 5 mm do ápice radicular foi cortado transversalmente e depois longitudinalmente. Uma das partes do ápice foi estudada na microscopia eletrônica de varredura e a outra foi fragmentada em pequenos pedaços e colocadas em um meio de transporte, sendo processada para o isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias. Bactérias foram isoladas em 13 (60%) dos 21 dentes. Bactérias anaeróbias estritas estavam presentes em 12 casos, e as anaeróbias facultativas em 8. Foram identificadas espécies anaeróbias dos gêneros: *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Veillonella*. Entre as bactérias facultativas, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* foram os gêneros mais prevalentes. *Enterococcus faecalis* estava presente em 3 casos. Os autores sugeriram que essa alta proporção de anaeróbios em dentes tratados endodonticamente e assintomáticos, era devido à técnica de coleta através da fragmentação de ápices de dentes extraídos, pois a coleta do canal radicular pode não refletir a total composição da microbiota no ápice radicular. Os autores sugeriram que, devido à ausência de contato com a microbiota oral, as bactérias isoladas eram derivadas de microrganismos que colonizaram o canal antes ou durante o tratamento endodôntico.

Lin *et al.* (1992), analisando os fatores associados ao fracasso do tratamento endodôntico de 236 dentes através da análise clínica, radiográfica e histobacteriológica, detectaram a presença de bactérias nos canais radiculares em 67% dos casos. Os autores relataram que a persistência da infecção bacteriana no sistema de canais radiculares, e a presença pré-operatória de uma lesão periapical constituíam os principais fatores associados ao insucesso endodôntico. A extensão apical da obturação do canal radicular, isto é, sobre-obturado ou sub-obturado, parecia não haver correlação com os fracassos do tratamento endodôntico.

Tani *et al.* (1992) isolaram bactérias dos canais radiculares de 40 dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical. Todos pacientes tinham dor à percussão e palpação, e radiograficamente todos os canais envolvidos revelaram obturações deficientes. As bactérias isoladas incluíam: *Bacteroides* spp., *Veillonella parvula*, *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus plantarum*, e *Propionibacterium propionica*.

Gomes *et al.* (1996a), com o objetivo de estudar a microbiota dos canais radiculares e sua associação com sinais e sintomas clínicos, realizaram coletas microbiológicas de 70 canais infectados, dos quais, 21 apresentavam tratamento endodôntico prévio e, em sua maioria, a presença de dor. *Propionibacterium* foi o gênero mais freqüentemente isolado nos canais com tratamento endodôntico prévio. Entretanto, espécies anaeróbias pertencentes ao gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, e também facultativas como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, também foram isoladas. Os autores verificaram a associação de dor com espécies de *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus* spp.

Molander *et al.* (1998) analisaram o estado microbiológico de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical visível radiograficamente. Os dentes estudados apresentavam-se assintomáticos, e com a obturação do canal apresentando uma distância máxima de 5 mm do ápice radiográfico. A remoção do material obturador foi realizada utilizando brocas de Gates-Glidden e limas endodônticas, e em 21 casos, foi utilizado clorofórmio como material solvente da guta-percha. Os resultados mostraram que bactérias estavam presentes em 68 dentes, porém o uso do clorofórmio foi considerado um fator influente, diminuindo o crescimento bacteriano. Dos 21 casos onde foi utilizado o clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas 10 casos (47,3%), enquanto nos 79

dentos restantes o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Um total de 117 amostras microbianas foi isolado, com 114 bactérias e 3 fungos. A maioria dos canais continha uma ou duas espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. As espécies isoladas foram: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., bacilos Gram-positivos anaeróbios, bacilos Gram-negativos facultativos, *Veillonella* spp., *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Candida* spp. *Enterococcus* foi o gênero bacteriano mais frequentemente isolado, presente em 47% dos canais com bactérias. Os autores concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente diferenciava, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, dos dentes com polpas necrosadas e enfatizaram a necessidade de novas estratégias de combate à infecção desses dentes durante o retratamento não-cirúrgico.

Sundqvist *et al.* (1998) realizaram coletas microbiológicas de 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com lesões periapicais visíveis radiograficamente. A técnica do retratamento foi realizada sem o uso de solventes da guta-percha. O crescimento bacteriano foi detectado em 24 casos, sendo caracterizado por monoinfecções de microrganismos predominantemente Gram-positivos (87% das bactérias isoladas), com proporções aproximadamente iguais de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). Os gêneros isolados foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. *Candida* spp. foram detectadas em 2 casos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüente, isolada em 38% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

Peciulene *et al.* (2000) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Vinte e cinco pacientes foram submetidos à reintervenção endodôntica e amostras microbiológicas foram colhidas antes e após o preparo do canal. Bactérias foram isoladas em 20 casos, sendo que *Enterococcus faecalis* foram isolados em 14 dentes (70%) e desses, em 9 casos estavam associados a outras bactérias, enquanto que em 5 amostras mostravam-se como monoinfecção. Mesmo quando associados a outros microrganismos, *Enterococcus faecalis* dominavam a microbiota. Na segunda coleta (após o preparo do canal) bactérias foram isoladas em somente 7 casos, onde *Enterococcus faecalis* estavam presentes em 5 casos, em cultura pura, e bactérias anaeróbias em 2. Concluíram que

Enterococcus faecalis foi a espécie dominante nos casos de insucesso endodôntico em pacientes da Lituânia.

Cheung & Ho (2001) investigaram a composição da microbiota em 24 canais tratados endodonticamente com lesão periapical assintomática, em pacientes chineses. Dezoito dentes previamente obturados com guta-percha foram analisados e 12 (66,7%) apresentaram crescimento bacteriano. Cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos foram os microrganismos mais frequentemente isolados, especialmente os gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. *Enterococcus* spp. e *C. albicans* não foram isolados neste estudo.

Pinheiro *et al.* (2003a) realizaram um estudo em 60 canais de dentes com insucesso endodôntico, destes, 51 canais apresentaram crescimento bacteriano. A microbiota era composta por bactérias anaeróbias facultativas (57,4%), predominantemente Gram-positivas (83,3%), sendo prevalente o gênero *Enterococcus* spp. 28 (46,7%). *Candida* spp. foram isoladas em 2 (3,3%) casos.

Pinheiro *et al.* (2003b) realizaram um estudo bacteriológico de 30 canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico e isolaram um total de 56 microrganismos, sendo 55 bactérias e 1 fungo dos 24 (80%) casos que apresentaram crescimento bacteriano. Os autores relataram que a microbiota era formada em sua maioria por monoinfecções (13/24 canais - 54%), composta por bactérias anaeróbias facultativas (58%), predominantemente Gram-positivas (80%), representadas pelos gêneros *Enterococcus* (36,7%) e *Streptococcus* (33,3%) e, em segundo plano, por bactérias anaeróbias estritas, em especial as do gênero *Peptostreptococcus* (23,3%). Foram ainda isoladas bactérias dos gêneros *Actinomyces* (13,3%), *Prevotella* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Gemella* (10%), *Fusobacterium* (6,7%), *Veillonella* (6,7%), *Lactobacillus* (6,7%), *Propionibacterium* (3,3%) e *Haemophilus* (3,3%). *Candida* spp. foi isolada em 1 caso.

Gomes *et al.* (2004) realizando um estudo microbiológico de 60 canais radiculares de dentes com polpas necróticas (n = 41, infecção primária) e também com tratamento endodôntico prévio (n = 19, infecção secundária) associadas a lesões periapicais. A microbiota da infecção primária mostra um equilíbrio de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a maioria anaeróbias estritas, contendo mais de 3 espécies por canal radicular. Por outro lado, a infecção secundária apresenta mais bactérias Gram-positivas,

anaeróbias facultativas, com cerca de 1-2 espécies por canal. Além disso, encontraram uma associação entre os casos de insucesso endodôntico e espécies do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pepstreptococcus* e *Fusobacterium*.

Zolleti *et al.* (2006) avaliaram a prevalência dos *E. faecalis* em dentes com e sem lesão periapical. Foi utilizado método de cultura e PCR (16S rRNA) para identificar as cepas. Por PCR, o *E. faecalis* foi detectado em 40 de 50 dentes (80%) e por cultura em 8 de 50 dentes (16%). De 27 canais sem lesão periapical o *E. faecalis* foi detectado em 22 casos (81,5%) por PCR e em 5 casos (18,5%) por cultura. De 23 dentes com lesão periapical, foi detectado *E. faecalis* em 18 casos (78%) por PCR e em 3 casos (13%) por cultura. Estes resultados colocam em dúvida a hipótese de que o *E. faecalis* seja o principal responsável pelo insucesso endodôntico, assim outros fatores relacionados também devam ser avaliados para esclarecermos esta dúvida.

Schirrmeister *et al.* (2009) coletaram microorganismos de pacientes durante o retratamento endodôntico de dentes associados a lesões periapicais. As bactérias foram caracterizadas por sua aparência morfológica e por testes bioquímicos e também através do sequenciamento com o primer 16S rRNA. Foram detectados microorganismos em 10 de 18 dentes. A maioria das amostras positivas apresentaram culturas mistas contendo de 2 a 8 espécies. Em dois casos o *E. faecalis* foi o único microorganismo detectado. Pela primeira vez a espécie *Vagococcus fluviialis* foi detectada no canal radicular. *Solobacterium moorei* e *Fusobacterium nucleatum* foram as espécies mais prevalentes. A presença de *F. nucleatum* estava associada à presença de *S. moorei* em 5 de 7 casos. Em todos os dentes com *Parvimonas micra* e *Dialister invisus*, *F. nucleatum* e *S. moorei* foram detectados. Além disso, membros de um gênero diferente foram detectados contendo características ainda não classificadas.

Enterococcus faecalis

Espécies de *Enterococcus* spp. pertenciam anteriormente ao gênero *Streptococcus*, classificadas como estreptococos do Grupo D de Lancefield. Trabalhos da década de 60 e 70 (Möller, 1966; Miranda, 1969; Nord & Wadsröm, 1973; Heintz *et al.*, 1975) referiam-se

a espécie de *Streptococcus faecalis*, que atualmente são denominadas *Enterococcus faecalis* (Rosan, 1997).

Enterococcus faecalis freqüentemente isolados de canais radiculares com infecções endodônticas persistentes (Bender & Seltzer, 1952; Möller, 1966; Goldman & Pearson, 1969; Cavaleri *et al.*, 1989; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003a; Stuart *et al.*, 2006), representam uma proporção pequena da microbiota primária, ou seja, de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais (Sundqvist *et al.*, 1992; Gomes, 1995; Sundqvist *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1996a; Stuart *et al.*, 2006). Para um microrganismo colonizar canais com um tratamento endodôntico prévio, ele deve sobreviver aos procedimentos antimicrobianos realizados na terapia endodôntica inicial e suportar períodos de privações nutricionais no canal radicular obturado (Siqueira & Roças, 2004).

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos e têm demonstrado resistência aos procedimentos endodônticos de desinfecção como o preparo químico-mecânico (Gomes *et al.*, 1996b; Sundqvist *et al.*, 1998).

Siren *et al.* (1997) demonstraram que *Enterococcus faecalis* podem penetrar no canal pela infiltração coronária, resistir ao tratamento e persistir após a obturação dos canais. Os autores relataram que os canais que continham espécies de *E. faecalis* resultaram em um maior número de casos com insucessos, necessitando de retratamento endodôntico, quando comparados com os dentes que não apresentavam essas bactérias na sua microbiota.

Sundqvist *et al.* (1998) analisaram em seu trabalho, a taxa de sucesso/insucesso dos dentes que foram submetidos ao retratamento, e verificaram que dos dentes 9 canais que continham *Enterococcus faecalis* na cultura inicial, 3 (33,3%) apresentaram a persistência desse microrganismo após o preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio a 0,5% e curativo com pasta de hidróxido de cálcio (Calasept), e resultaram em insucesso após um período de preservação de 4 anos. Nos 24 dentes que apresentaram crescimento bacteriano, 19 casos eram caracterizados como monoinfecções, 4 apresentavam 2 microrganismos, e apenas 1 caso apresentava uma cultura polimicrobiana contendo 4 espécies bacterianas.

Love (2001) demonstrou que *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo sobreviver aos procedimentos químico-mecânicos. Estes microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio que é a

medicação intracanal comumente utilizada para a desinfecção dos canais radiculares (Haapasalo & Orstavik, 1987). Além desses fatores, *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias (Fabricius *et al.*, 1982, Sundqvist *et al.*, 1998).

Figor *et al.* (2003) demonstraram *in vitro* a capacidade do *Enterococcus faecalis* de suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes em um estado metabólito mínimo. Os autores demonstraram a sobrevivência de um pequeno remanescente da população de *Enterococcus faecalis* na água (por 4 meses) e em meios com nutrientes limitados (por mais de 4 meses). Estas células bacterianas foram capazes de retornar ao crescimento após a adição de nutrientes. Todos esses fatores podem contribuir para a alta prevalência desses microrganismos em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais (Siqueira & Roças, 2004).

Kaufman *et al.* (2005) estudaram 58 dentes e identificaram *E. faecalis* em casos de retratamento endodôntico com e sem lesão periapical. A prevalência do *E. faecalis* foi de 12%, sendo também isolados de dentes sem lesão periapical, mostrando que estas espécies não são responsáveis pela doença.

Stuart *et al.* (2006) reafirma em sua revisão de literatura que o *Enterococcus faecalis* são microrganismos frequentemente encontrados em infecções endodônticas assintomáticas e persistentes. Nos trabalhos avaliados ao longo dos tempos, a prevalência deste microrganismo nas infecções endodônticas, variam entre 24% a 77%. Estes achados podem ser suportados pelos fatores de resistência e de virulência dos *E. faecalis*, como sua habilidade de competir com outros microrganismos, de invadir os túbulos dentinários e de sobreviver em carência nutricional. Os autores ainda sugerem que uma boa técnica de assepsia durante a terapia endodôntica, o aumento do diâmetro do preparo apical e o uso de uma boa substância química auxiliar como a Clorexidina 2%, e o hipoclorito são métodos efetivos ao combate ao *E. faecalis*. As pesquisas com *E. faecalis* devem continuar e sua erradicação do sistema de canais radiculares podem definir bem o futuro da endodontia.

Schirrmeister *et al.* (2007) detectaram a presença de microrganismos por cultura e PCR em dentes obturados assintomáticos com presença de lesão periapical. Depois da desobturação foram coletadas amostras de 20 casos, e depois de cada passo do protocolo de

retratamento. A prevalência de microorganismos foi de 60% por cultura e 65% por PCR. Em 4 de 12 amostras (31%) foi encontrado o *E. faecalis*.

***Staphylococcus* spp.**

Staphylococcus spp. estão associados aos abscessos dentais, abscessos associados com implantes osseointegrados e osteomielites, entre outros aspectos clínicos. Não são frequentemente isolados nos canais, podendo ser contaminantes externos (Myers *et al.*, 1969). Porém, Goldman & Pearson (1969) e Gomes *et al.* (1996b) detectaram espécies de *Staphylococcus* spp. após o saneamento dos canais, que também são resistentes aos anti-sépticos e desinfetantes mais usados na endodontia.

Reader *et al.* (1994) isolaram *Staphylococcus aureus*, como microrganismo único, após incubação anaeróbia e aeróbia do exsudato de um dente com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical persistente. Os autores discutiram a patogenicidade do *Staphylococcus aureus*, e relataram que embora essas espécies não sejam comumente isoladas dos canais radiculares, quando presentes, podem permanecer viáveis por longos períodos devido à sua alta resistência a alterações provocadas no meio. Foi realizada a cultura microbiológica e teste de suscetibilidade antimicrobiana, que demonstrou resistência bacteriana a penicilina, amoxicilina e metronidazol, e sensibilidade a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, que foi administrado para auxiliar o tratamento da infecção persistente.

Vigil *et al.* (1997) estudaram microrganismos de 28 lesões periapicais persistentes ao tratamento endodôntico. Os microrganismos mais comumente isolados foram: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, “*Wolinella recta*”, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp.

Sunde *et al.* (2002) investigaram a microbiota de 36 dentes que não responderam bem ao tratamento endodôntico. Apenas um caso apresentou cultura negativa. Aproximadamente metade (51%) das cepas isoladas eram anaeróbias, sendo 79,5% Gram-positivas. Microrganismos facultativos dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, e *Candida* foram isolados de 27 (75%) lesões persistentes.

Propionibacterium e Actinomyces

Os gêneros *Propionibacterium* e *Actinomyces* têm sido associados a lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico (Sundqvist & Reuterving, 1980; Nair *et al.*, 1984; Sjögren *et al.*, 1988, 1997). Essas bactérias se apresentam menos suscetíveis aos procedimentos químico-mecânicos da terapia endodôntica (Gomes *et al.*, 1996b; Sjögren *et al.*, 1997) e, uma vez instalados no canal radicular, podem atingir os tecidos periapicais e sobreviver fora do canal radicular, causando infecções que só podem ser removidas cirurgicamente (Sundqvist & Reuterving, 1980; Nair *et al.*, 1984; Sjögren *et al.*, 1988, 1997).

Sundqvist *et al.* (1998) relacionaram um caso de lesão periapical persistente após o retratamento endodôntico, com a presença de *Actinomyces israelii* no canal no momento da obturação, mesmo após a instrumentação e curativo com pasta de hidróxido de cálcio (Calasept).

Enterobactérias

Bacilos entéricos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa* (Ranta *et al.*, 1988) e fungos (Waltimo *et al.*, 1997) foram isolados em casos de infecções que não responderam adequadamente aos procedimentos químico-mecânicos durante o tratamento endodôntico convencional, geralmente com persistência de exsudato e dor à percussão.

Haapasalo *et al.* (1983), realizando a investigação microbiológica de um dente com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical, isolaram *Enterobacter cloacae*, um bacilo Gram-negativo facultativo, como microrganismo único presente no canal radicular. Os autores relataram que esse microrganismo era um bacilo entérico ocasionalmente encontrado no canal radicular, porém quando isolado, parecia estar associado a infecções endodônticas persistentes. Os autores, discutindo a via de entrada dos bacilos entéricos Gram-negativos nos canais radiculares, citaram a contaminação através de instrumentos manipulados com as mãos, de soluções irrigadoras não-estéreis, e de canais deixados em comunicação com a cavidade oral.

Segundo Siren *et al.* (1997), as bactérias entéricas não estão presentes comumente na microbiota de canais radiculares infectados. Essa diferença da composição da microbiota de dentes com infecções persistentes pode ser devido a dois fatores: a presença de uma pequena quantidade de bactérias entéricas na infecção original do canal radicular, que aumenta sua proporção durante o tratamento endodôntico devido a maior suscetibilidade de outras bactérias à terapia endodôntica; ou bactérias entéricas podem entrar no canal radicular durante o tratamento endodôntico devido ao isolamento inadequado do dente, à infiltração pelo material restaurador temporário, ou quando o canal é deixado aberto para drenagem. Com o objetivo de estudar a relação entre os procedimentos clínicos e a presença de bactérias entéricas facultativas, os autores realizaram coletas microbiológicas dos canais radiculares durante diferentes procedimentos ao longo do tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que além de *Enterococcus faecalis*, outras bactérias entéricas facultativas (*Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) e *Pseudomonas* spp., foram encontrados mais freqüentemente em casos onde os canais radiculares não foram selados em algum momento do tratamento endodôntico, ou em casos com grande número de sessões. *Enterococcus faecalis* foram as espécies mais freqüentemente isoladas. Os autores enfatizaram a importância do controle da cadeia asséptica durante a terapia endodôntica no prognóstico do tratamento.

Peciulienne *et al.* (2001) objetivaram determinar a ocorrência de leveduras, bacilos entéricos Gram-negativos e espécies de enterococos em canais obturados com periodontite apical crônica. Leveduras, todas *C. albicans*, foram isoladas em 18% dos casos, sempre associadas a outras bactérias (50% das situações com *E. faecalis*). Em 3 casos, dos 40 estudados, bacilos entéricos Gram-negativos foram identificados (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*) sempre coexistindo com *E. faecalis*. A única espécie de enterococos isolada foi *E. faecalis*, presente em 64% dos dentes, sendo em 11 como cultura pura.

Ferrari *et al.* (2005) isolaram microrganismos de dentes com polpas necrosadas e 22% das espécies eram *Enterococcus* spp., enterobactérias e fungos. As coletas feitas após a instrumentação não apresentaram estes microrganismos, ao contrário das coletas pós-medicação intracanal que apresentaram novamente culturas de *Enterococcus* spp..

Davis *et al.* (2005) isolaram *Enterobacter cloacae* em dentes infectados que possuíam restaurações metálicas e no sequenciamento genético destas espécies encontraram o gene *silE*, responsável pela resistência à prata.

Fungos

Estudos têm demonstrado a presença de *Candida* spp. em aproximadamente 3% dos casos de canais com insucesso endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro, 2003a,b). A presença de fungos no canal radicular também pode ser resultado de contaminação durante o tratamento endodôntico (Waltimo *et al.*, 1997), e pode estar associada ao insucesso de dentes tratados endodonticamente (Nair *et al.*, 1990a; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998).

Os fungos têm demonstrado resistência a medicamentos comumente usados no processo de desinfecção endodôntica, o que pode explicar a sua presença em casos de canais com periodontites apicais persistentes (Waltimo *et al.*, 1999; Siqueira & Sen, 2004). Esses microrganismos, assim como as espécies de *Enterococcus faecalis*, parecem ter a habilidade de utilizar oportunidades criadas pela remoção de outros microrganismos, e também ter capacidade de viver em um meio pobre em nutriente, como o canal de dente tratado endodonticamente (Sundqvist *et al.*, 1998; Siqueira & Sen, 2004).

Waltimo *et al.* (1997), utilizando o meio TSBV (Tryptose-soy-agar enriquecido com bacitracina e vancomicina) para o isolamento primário de fungos e métodos de identificação específicos, isolaram fungos em 692 canais radiculares com infecções persistentes após o preparo químico-mecânico, sendo a *Candida* spp. 7% dos casos (48 amostras). Baumgartner *et al.* (1999), utilizando o método de PCR (Polymerase chain reaction) detectaram *Candida albicans* em 5 de 24 (21%) canais radiculares infectados.

Siqueira & Sen (2004) esclarecem que os fungos são microorganismos eucariontes que podem estar participando das infecções endodônticas e possivelmente também são responsáveis pelas causas das periapicopatias. Estes possuem atributos virulentos que incluem: capacidade de se adaptarem a várias condições ambientais, adesão a superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, morfologia transitória, formação de biofilme entre outras. Fungos tem sido ocasionalmente detectados em infecções endodônticas primárias, mas

aparecem mais freqüentemente em canais obturados nos casos de insucesso endodôntico. *Candida albicans* é a espécie mais encontrada nos casos de infecções endodônticas e também tem sido considerada uma espécie dentinofílica, devido a sua facilidade de invadir a dentina. *C. albicans* também foi resistente a algumas medicações intracanal utilizadas na endodontia, o que vem a explicar porque este microrganismo tem sido associado a casos de infecções endodônticas persistentes.

Infecção extra-radicular

A existência de uma rarefação óssea periapical, detectada anteriormente à instituição da terapia endodôntica, eleva consideravelmente o número de fracassos. Esse achado clínico encontra respaldo nos atuais conceitos microbiológicos, comprovando que as lesões periapicais sempre estão relacionadas com canais contaminados e, muitas vezes, os microrganismos não limitam sua colonização apenas à luz do conduto ou à profundidade dos túbulos dentinários, mas podem também encontrar abrigo na região periapical, infectando o cimento da superfície radicular (Cheung, 1996).

Em uma minoria dos casos, segundo Cheung (1996), o insucesso endodôntico pode estar relacionado a uma infecção extracanal. Estudos têm demonstrado a presença de bactérias na superfície externa radicular (Tronstad *et al.*, 1990; Molven *et al.*, 1991; Lomçah *et al.*, 1996; harn *et al.*, 1998) ou na lesão periapical (Sundqvist & Reuterving, 1980; Nair, 1987; Tronstad *et al.*, 1987; Sjögren *et al.*, 1988; Iwu *et al.*, 1990; Wayman *et al.*, 1992; Wasfy *et al.*, 1992; Abou-rass & Bogen, 1998).

Abou-Rass e Bogen (1998) analisaram 13 ápices que foram removidos de dentes que haviam sido tratados endodonticamente e que apresentavam lesão periapical refratária ao tratamento. Em 100% dos casos, microrganismos puderam ser isolados do ápice, sendo 63,6% constituído por anaeróbios estritos e o restante por facultativos. Os mais prevalentes foram *Actinomyces* spp. (31,8%), 18,2% de *Streptococcus* spp., enquanto bacilos entéricos Gram-negativos foram isolados em 4,6% dos casos. Os autores concluíram que existia correlação entre a presença de microrganismos e radiolucência periapical.

Segundo Siqueira Jr. & Lopes (1999), poucas espécies bacterianas podem ser capazes de sobreviver no interior dos tecidos perirradiculares, tornando-se, assim, responsável pelo insucesso do tratamento endodôntico. A sobrevivência nesta região, onde

as defesas do hospedeiro têm maior acesso ao agente infeccioso, somente é possível para os microrganismos dotados da capacidade de anulá-las.(Siqueira Jr, 1997).

Estudos têm reportado o isolamento de espécies de *Actinomyces israeli* (Sundqvist & Reuterving, 1980; Sjögren *et al.*, 1997), *Actinomyces* spp. (NAIR *et al.*, 1984) e “*Arachnia propionica*” (Sjögren *et al.*, 1988) de lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico, caracterizando uma actinomicose periapical. Fidgor *et al.* (1992), estudando a patogenicidade de espécies de *Actinomyces israeli* e “*Arachnia propionica*” em animais, observaram que uma cepa bacteriana isolada de uma lesão periapical pode formar colônias coesas, com grande número de células, escapando assim coletivamente da fagocitose que deveria ser realizada pelas células de defesa. A espécie “*Arachnia propionica*” foi incluída no gênero *Propionibacterium*, sendo atualmente denominada *Propionibacterium propionicum* (Sundqvist, 1994).

Um outro mecanismo bacteriano de evasão às defesas do hospedeiro é o arranjo em biofilme das bactérias presentes na superfície externa radicular. O biofilme perirradicular é caracterizado por uma população de microrganismos aderidos ao cimento e/ou à dentina na porção apical da raiz, que estão envolvidos por seus produtos extracelulares (camada polissacarídica externa conhecida como glicocálice), os quais formam uma matriz intermicrobiana. A estrutura da matriz polissacarídica que envolve o biofilme limita o acesso de moléculas de defesa (anticorpos e complemento) e de células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) (Palmer & White, 1997; Siqueira & Lopes, 1999).

Tronstad *et al.* (1990) analisaram, através da microscopia eletrônica de varredura, a superfície dos ápices radiculares de 10 dentes com tratamento endodôntico prévio e lesões periapicais persistentes que foram submetidos à cirurgia periapical. Os autores verificaram que na região adjacente ao forame apical, nas irregularidades e reabsorções cementárias, havia uma placa bacteriana formada por uma variedade de formas (predominantemente cocos e bacilos), que eram mantidas juntas por um material extracelular.

Harn *et al.* (1998) relataram um caso de lesão periapical e fístula persistente ao tratamento endodôntico, no qual, no ato cirúrgico, foi verificado um depósito semelhante a um cálculo no ápice da raiz. Os autores sugeriram que o cálculo era originado da calcificação da placa bacteriana da superfície externa apical, representando um meio propício para retenção de bactérias extraradiculares, o que, nesse caso, poderia ter um papel

importante na manutenção da inflamação periapical após um tratamento endodôntico bem realizado.

Hasegawa-Nakano (1999) estudaram *in vitro* a capacidade de microrganismos isolados de canais radiculares infectados de formar o biofilme. Os autores selecionaram para o estudo espécies de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureginosa* e *Candida albicans*, por serem bactérias de difícil eliminação durante a terapia endodôntica, e testaram a capacidade de aderência a um disco de colágeno colocado em um frasco contendo meio de cultura. O disco foi examinado através da microscopia eletrônica de varredura, e foi observada uma substância semelhante ao glicocálice em todos os microrganismos isolados com exceção da *Candida albicans*. Os autores sugeriram que esses microrganismos tinham a capacidade de formar o biofilme devido à produção de substâncias semelhantes ao glicocálice.

Infiltração coronária

O insucesso do tratamento endodôntico também tem sido relacionado à ausência de um selamento coronário adequado após o tratamento endodôntico (Swatz *et al.*, 1983; Ray & Trope, 1995; Heling *et al.*, 2002). Trabalhos demonstram que bactérias e seus produtos podem penetrar nas falhas marginais de uma restauração defeituosa e na interface entre o material obturador e o canal radicular, e atingir a região periapical (Torabinejad *et al.*, 1990; Magura *et al.*, 1991; Cheung, 1996).

O conceito da infiltração coronária como umas das causas do insucesso da terapia endododôntica foi descrito por Marshall & Massler (1961), que estudaram o papel do selamento coronário em dentes tratados endodonticamente demonstrando que a infiltração ocorria a despeito da presença da restauração coronária. Segundo Wilcox & Diaz-Arnold (1989) a microinfiltração coronária ao redor das restaurações tem o potencial de dissolver o cimento obturador, comprometendo o prognóstico do tratamento endodôntico.

Analisando o efeito da infiltração coronária em dentes tratados endodônticamente expostos à saliva, Magura *et al.* (1991) observaram contaminação através da infiltração de corantes e da análise histológica e verificaram que após 90 dias, a infiltração foi significativamente maior do que os outros períodos estudados (2, 7, 14 e 28 dias). Os

autores sugeriram a realização do retratamento endodôntico em dentes sem restaurações coronárias e expostas ao meio bucal por três meses ou mais. Em casos onde o canal tiver preparo para pino com menor quantidade de material obturador, este período deveria ser reduzido na indicação do retratamento.

Swartz *et al.* (1983), avaliando os fatores de sucesso e insucesso de 1.007 dentes tratados endodonticamente, relataram que dentes com restaurações coronárias impróprias ou ausentes apresentavam um índice de sucesso significativamente menor quando comparado aos dentes com restaurações adequadas.

Ray & Trope (1995) avaliaram 1.010 dentes tratados endodonticamente e restaurados, com o objetivo de avaliar a relação entre a qualidade da restauração coronária e da obturação do canal radicular no índice de sucesso do tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que tratamentos endodônticos e restaurações coronárias de boa qualidade resultaram em um sucesso de 94%; tratamentos endodônticos adequados e restaurações defeituosas, o índice caía para 44,1%; tratamentos endodônticos com falhas e boas restaurações coronárias, o índice de sucesso era de 67,6%; e tratamento endodônticos e restaurações inadequadas, um baixo índice de 18,1%. Os autores concluíram que a qualidade da restauração coronária era significativamente mais importante do que a qualidade técnica do tratamento endodôntico para manutenção da saúde periapical de dentes tratados endodonticamente.

Torabinejad *et al.* (1990) estudaram *in vitro* a infiltração bacteriana em 45 dentes tratados endodonticamente e não selados, expostos as espécies de *Staphylococcus epidermidis* e *Proteus vulgaris*, e observaram que 50% dos canais estavam completamente contaminados por *Staphylococcus epidermidis* após 19 dias, e por *Proteus vulgaris* após 42 dias.

Lage-Marques *et al.* (1996) avaliando 1.805 dentes tratados endodonticamente, observaram que 25,7% dos casos apresentavam restaurações temporárias, um fator crítico no sucesso desses tratamentos. Estudos têm demonstrado que os materiais restauradores temporários não oferecem um selamento coronário adequado, permitindo infiltração de bactérias (Keller *et al.*, 1981; Deveaux *et al.*, 1992; Imura *et al.*, 1997).

Hommez *et al.* (2002) avaliaram o impacto da restauração coronária com bases clínicas e radiográficas e a qualidade das obturações na resposta periapical. Foram

radiografados 745 dentes e as características clínicas e radiográficas da coroa foram avaliadas quando a infiltração marginal e cárie. A obturação foi avaliada quanto ao comprimento e homogeneidade e o periápice quanto à presença ou ausência de lesão apical. A relação entre o estado coronário, qualidade da obturação e a resposta periapical foi determinada. Os resultados apresentaram 33% dos dentes com presença de lesões periapicais. Dentes com restaurações coronárias consideradas clinicamente boa ou ruim apresentavam lesões periapicais em 31,1% e 36,8%, respectivamente; esta diferença não foi estatisticamente significativa. Todavia, a qualidade das restaurações coronárias avaliadas radiograficamente influenciou nas condições periapicais tendo significância estatística ($p < 0,001$) e apresentando lesão em 23,8% e 49,1%, respectivamente para restaurações satisfatórias e insatisfatórias. Assim, concluíram que um bom tratamento endodôntico e uma boa restauração influenciam no sucesso do tratamento endodôntico.

Adib *et al.* (2004) estudaram a microbiota de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais persistentes e infiltração coronária. Oito dentes extraídos foram seccionados transversalmente em 3 partes: a coroa e dois segmentos da raiz (coronário e apical), que foram coletados individualmente. Microrganismos foram isolados de todos os casos com um total de 252 cepas isoladas. A grande quantidade de microrganismos isolados nos canais radiculares se deve, segundo os autores, ao fato de todas as amostras apresentarem infiltrações coronárias e, também, à sensibilidade da técnica de coleta e cultura utilizadas. O maior número de cepas foi encontrado em casos com infiltração coronária e obturações endodônticas de má qualidade. A porção coronária apresentava uma diversidade bacteriana maior ou igual à porção apical na maioria dos canais radiculares. Houve um predomínio de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*.

Estrela *et al.* (2008) relataram que a prevalência das lesões periapicais só diminuía quando associadas a dentes tratados com alta qualidade técnica. Além disso, ressaltou que restaurações inadequadas aumentaram a prevalência de lesões periapicais mesmo quando o tratamento endodôntico era considerado de boa qualidade.

Zehnder & Guggenheim (2009) em uma revisão de literatura, estudaram as razões da alta ocorrência de enterococcus em dentes com tratamento endodôntico. O dente despulpado aparenta ser o habitat para este microorganismo, especialmente o *E. faecalis*.

Mas, na literatura sobre cárie em dentina, pode ser concluído que, ao contrário do que se acreditava antes, enterococcus são raramente encontrados em lesões cariosas. O mesmo acontecia em infecções primárias, mas existem muitas incertezas sobre este assunto, pois o selamento coronário e a história dos dentes abrigar *E. faecalis* não foi ainda investigada em detalhes.

O selamento coronário definitivo é recomendado como parte integrante do tratamento endodôntico para a obtenção do sucesso endodôntico (Adib *et al.*,2004; Hommez & Moor, 2005).

Microbiota da saliva / Ecosistema bucal

Desde o nascimento o homem está cercado por um número incontável de microrganismos. Muitos deles (cerca de 100 trilhões), na verdade, estabeleceram uma morada na superfície de nossa pele, de nossos dentes e da mucosa que tem contato com o meio externo. Assim, vários dos nossos compartimentos orgânicos abrigam uma série de microrganismos que infectam esses locais mesmo no estado de saúde, constituindo as microbiotas próprias de cada local. Cada região do organismo é considerada um habitat diferente, pois oferece diferentes condições ambientais, motivo da não existência de uma microbiota única, igual em todas as regiões. Existem diferentes composições teciduais, portanto, diferentes receptores para a aderência e diferentes nutrientes necessários para cada microrganismos, diferentes teores de umidade, diferentes pH, maior ou menor teor de oxigênio, entre outros fatores. É evidente que só colonizam uma certa região, um certo habitat, os microrganismos que se adaptam á sua condição ecológica. A cavidade bucal, em função da sua complexidade anatômica, apresenta vários sítios ecológicos, sendo a mais complexa de todo o corpo humano: só de bactérias existem mais de 30 gêneros diferentes, abrangendo mais de 500 espécies diferentes (De Lorenzo, 2004).

Socransky & Haffajee (2002) relataram que, na boca, existem aproximadamente 350 espécies bacterianas já cultivadas e mais de 200 que foram reconhecidas por métodos genéticos. Em número total de microrganismos, a microbiota bucal só pode ser comparada com a microbiota intestinal, mas a bucal é bem mais complexa devido a existência de dentes.

O uso de substâncias antimicrobianas, embora eventual, pode desequilibrar a microbiota bucal. A utilização de antibióticos de amplo espectro de ação durante algum tempo, suprime a grande maioria das bactérias, mas ao mesmo tempo favorece o desenvolvimento de espécies resistentes e de fungos como *Candida albicans*. A microbiota bucal pode sofrer algumas modificações em função de alterações sistêmicas fisiológicas e patológicas como: alterações hormonais, estresse, diabetes, leucemia, imunodeficiências e quimioterapias anti-câncer (De Lorenzo, 2004).

Em 1964, Engström postulou que havia uma correlação direta entre a ocorrência de *Enterococcus* spp. na cavidade oral e na câmara pulpar. Egan *et al.* (2002) relacionaram a prevalência e a diversidade dos fungos nas amostras de saliva e canal radicular dos mesmos pacientes, associando também os fatores clínicos. Fungos não foram freqüentemente encontrados, estando presentes em 6/60 canais radiculares (10%). Dos casos positivos, 2 eram dentes infectados e não tratados (de um total de 35), enquanto 4 eram casos de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais (de um total de 25). Concluíram que a presença de fungos no canal radicular está associada à sua presença na saliva, independentemente da restauração coronária ou tratamento endodôntico prévio.

Sedgley *et al.* (2005) estudaram a prevalência de enterococci oral pelo método PCR. *Enterococcus faecalis* foram detectados em 11% de 100 pacientes que estavam em tratamento endodôntico e em 1% de 100 estudantes que não possuíam nenhum tratamento endodôntico. As cepas de *E. faecalis* apresentaram alguns fatores de virulência como produção de hemólise, gelatinase e bacteriocina. Além disso, todas foram suscetíveis a ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina e vancomicina.

Sedgley *et al.* (2006) invertigaram pelo método de cultura e PCR a presença de *E. faecalis* em diversos sítios da cavidade oral de 41 pacientes (n=136) em terapia endodôntica. A prevalência foi de 68% dos pacientes, sendo apenas 5% detectados nos canais radiculares. *E. faecalis* foram mais detectados na língua do que no sulco gengival, fluido salivar e canal radicular. O método de identificação por PCR foi mais eficaz do que o método de cultura para detecção de *E. faecalis* da cavidade oral.

Razavi *et al.* (2007) sugere que os enterococcus são microorganismos transitórios do ecossistema oral saudável e se originam dos alimentos. Afinal são raramente detectados na cavidade oral de indivíduos saudáveis e continuam sendo associados aos canais

endodôticamente tratados. A real origem dos enterococcus continua incerta. Este estudo piloto reinvestigou a prevalência de enterococcus na cavidade oral de indivíduos saudáveis, a detecção de enterococcus em amostras de queijo e a colonização dos mesmos na cavidade oral após a ingestão de queijo enterococcus positivos. Foi coletado o fluido oral de 50 estudantes de odontologia resultando em amostras negativas para enterococcus. Foram estudadas 20 amostras de queijo de supermercados locais, as quais apresentaram culturas positivas para enterococcus. Voluntários ingeriram 10g de queijo com alta concentração de *E. faecalis*. O fluido oral foi coletado 1, 10 e 100 minutos após a ingestão. A média de UFC após 1 min de ingestão foi de 5,5 no fluido oral. A contagem bacteriana foi reduzida após 10 min, e caiu ainda mais depois de 100 minutos e após uma semana estava abaixo do limite de detecção. Os autores concluíram que a colonização do *E. faecalis* na cavidade oral é transitória e ao mesmo tempo corrobora com a hipótese de que a origem destes microrganismos pode ser os alimentos.

Zehnder & Guggenheim (2009) acreditam que a explicação mais aceita sobre a alta incidência de *E. faecalis* em canais radiculares tratados é que ele entra depois do tratamento endodôntico, mas ainda não se sabe qual seria a sua origem. O achado mais intrigante neste contexto é que o enterococcus não parece ser colonizadores da cavidade oral. Os autores acreditam que os mesmos são transitórios, a menos que haja sítios específicos para abrigá-los, tais como canais abertos e necrosados, ou canais radiculares tratados. A origem desta infecção por *E. faecalis* seriam os alimentos, idéia sugerida em alguns trabalhos. Porém, microorganismos transitórios da cavidade oral devem ser investigados e as mudanças do ecossistema oral pode criar condições favoráveis para infecção.

Outros fatores associados ao insucesso endodôntico

Embora os microrganismos sejam os principais agentes etiológicos dos casos de fracasso da terapia endodôntica, outros fatores independentes podem afetar adversamente o prognóstico do tratamento endodôntico (Nair *et al.*, 1999).

Nair *et al.* (1990b) relataram um caso de reação de corpo estranho dos tecidos periapicais a um material obturador dos canais radiculares. O estudo consistiu na biópsia de uma lesão periapical assintomática persistente após o tratamento endodôntico, que foi verificada à luz da microscopia óptica e eletrônica de varredura. A única característica da

lesão era a presença de células multi-nucleadas semelhantes a células gigantes da reação de corpo estranho e a presença de magnésio e silicone, que foram considerados remanescentes do excesso do material obturador do tratamento endodôntico prévio.

Lin *et al.* (1991) relataram que tecidos necróticos e materiais obturadores nocivos poderiam agir como irritantes, causando uma inflamação periapical. Os autores também encontraram casos diagnosticados como cistos apicais, que foram considerados fatores de insucesso.

Nair *et al.* (1993), através da análise, em microscopia óptica e eletrônica de varredura, da biópsia de uma lesão que não regrediu após o tratamento endodôntico, relataram que a lesão foi diagnosticada como cisto e apresentava um grande número de cristais de colesterol no tecido conjuntivo que circundava o revestimento epitelial da loja cística. Uma vez que microrganismos não foram detectados, os autores atribuíram a causa da persistência da lesão a fatores endógenos, como o acúmulo de cristais de colesterol e a própria condição cística da lesão.

Nair *et al.* (1999), no estudo de biópsias de 6 lesões periapicais persistentes ao tratamento endodôntico, encontraram 2 casos com infecções persistentes no interior do sistema de canais radiculares, um caso de cisto, 2 casos de tecido de cicatrização denominado escara apical, e um granuloma. Os autores confirmaram estudos prévios de que infecção intraradicular e cistos periapicais são causas importantes do insucesso endodôntico, porém, algumas radiolucências periapicais podem ocasionalmente ser devido à cura.

Tratamento do insucesso endodôntico

As principais modalidades de tratamento dos insucessos endodônticos são o retratamento convencional e a cirurgia periapical (Friedman & Stabholtz, 1986; Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997). Cada modalidade apresenta vantagens e riscos específicos, o que exige uma análise criteriosa da situação clínica, para optar pelo tratamento mais indicado (Friedman & Stabholtz, 1986).

Como a maioria dos fracassos endodônticos resulta de uma proliferação bacteriana dentro do canal do dente com tratamento endodôntico prévio, a razão para se realizar o

retratamento convencional, isto é, a desinfecção do sistema de canais radiculares, obedece tanto aos princípios biológicos quanto aos princípios técnicos que regem a terapia endodôntica (Hepworth & Friedman, 1997). Assim, o retratamento endodôntico é, de acordo com a maioria dos autores, o tratamento de primeira escolha, porém a cirurgia periapical consiste em um tratamento adicional nos casos em que o retratamento fracassou ou não foi possível de ser realizado (Friedman & Stabholtz, 1986; Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997, Ruddle, 1997).

O retratamento endodôntico consiste em realizar a remoção do material obturador, a reinstrumentação e reobturação do sistema de canais radiculares, com o objetivo de superar as deficiências da terapia anterior. O retratamento busca obter, radiograficamente, uma imagem que revele uma obturação adequada do canal radicular, quanto à compactação e ao limite apical, permitindo supor uma favorável evolução quanto à reparação tecidual (Lopes *et al.*, 1999).

É importante ressaltar que a realização do retratamento convencional, antes da cirurgia periapical, aumenta o índice de sucesso da mesma (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997).

A cirurgia periapical oferece um acesso imediato ao ápice radicular. Nesse procedimento, é possível realizar a limpeza dos tecidos ao redor do ápice; a apicectomia para remoção de 2 a 3 mm do ápice, que freqüentemente contém ramificações dos canais com infecção; e a obturação retrógrada para um bom selamento periapical (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997).

Os índices de sucesso das duas modalidades de tratamento, retratamento convencional e cirúrgico, são semelhantes, não apresentando diferenças estatísticas nos estudos realizados (Allen *et al.*, 1989; Hepworth & Friedman, 1997). Allen *et al.* (1989), analisando retrospectivamente 633 casos, mostraram que a taxa de sucesso do retratamento convencional era de 72,7%, e o cirúrgico com obturação retrógrada era de 60%. Hepworth & Friedman (1997), em uma revisão da literatura, estimaram uma média de sucesso de 66% e 59% dos retratamentos não-cirúrgicos e cirúrgicos, respectivamente.

O uso de antibióticos sistêmicos na endodontia

A razão para o uso de antibióticos sistêmicos se baseia em cinco fatores: indicação apropriada, habilidade da droga de alcançar o sítio de infecção em concentrações adequadas, eficácia da droga contra os microrganismos, efeitos adversos mínimos ao paciente e estado do sistema imune do paciente (Walker, 1992; Grad, 1997).

O uso de antibióticos por via sistêmica, nos casos de infecções endodônticas, está indicado apenas quando infecções periapicais agudas apresentam sinais de disseminação do processo infeccioso, ou sinais e sintomas de ordem sistêmica (Abbott *et al.*, 1990; Grad, 1997; Andrade, 1999).

O uso indiscriminado dos antibióticos tem levado ao aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Tomasz, 1994). O mecanismo de resistência resulta de alterações fisiológicas ou estruturais da célula bacteriana, que representa uma estratégia de sobrevivência ao ataque abusivo dos agentes antimicrobianos (Forbes *et al.*, 1998).

Walton & Chiappinelli (1993) condenaram a prática comum de muitos dentistas de prescreverem antibióticos aos pacientes após procedimentos endodônticos, alegando que não há evidência de que o antibiótico reduza a dor ou acelere o processo de cura.

Harrison (1999) alertou para o problema do surgimento de infecções resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis, que não respondem ao tratamento. Forbes *et al.* (1998), relataram que existiam espécies de *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas aureginosa*, para as quais não havia terapia antibiótica eficaz. Rotimi *et al.* (1999), em seu estudo, encontraram espécies de *Bacteroides* spp. multi-resistentes a drogas comumente utilizadas para tratar infecções anaeróbias.

O uso indiscriminado de antibióticos pelo dentista deve ser desencorajado, prevenindo um efeito em longo prazo sobre uma população inteira, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento da resistência bacteriana (Abbott *et al.*, 1990).

Infecções crônicas geralmente não requerem terapia antibiótica, exceto durante uma exarcebação aguda (Abbott *et al.* 1990). Os autores explicam que lesões periapicais crônicas estão associadas a dentes com polpas necrosadas ou com tratamento endodôntico prévio, que não possuem nenhum suprimento sanguíneo. Logo, quando um antibiótico é administrado por via sistêmica, a concentração de antibiótico que alcança o local de

infecção, ou seja, o canal radicular é insignificante e insuficiente para inibir o crescimento bacteriano.

Embora antibióticos de uso sistêmico não sejam normalmente utilizados no tratamento de doenças crônicas, em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana eles se tornam um importante complemento à terapêutica endodôntica, sendo utilizados em regimes profiláticos (Abbott *et al.* 1990; Grad, 1997).

Debelian *et al.* (1995), com o objetivo de estudar a bacteremia associada ao tratamento endodôntico, realizaram coletas microbiológicas de 26 canais radiculares associados a periodontites apicais crônicas antes da instrumentação, e coletas sanguíneas durante e 10 minutos após a instrumentação endodôntica. Microrganismos anaeróbios foram isolados de todos os canais radiculares e de 11 coletas sanguíneas. As espécies microbianas isoladas da corrente sanguínea foram: *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus sanguis*. Testes bioquímicos e antibiogramas revelaram que os isolados dos canais radiculares e do sangue tinham o mesmo padrão. Os resultados demonstraram que os microrganismos encontrados no sangue tinham como fonte o canal radicular.

Em pacientes de risco, a profilaxia antibiótica é recomendada nos seguintes procedimentos endodônticos, de acordo com as recomendações preconizadas pela *American Heart Association*: instrumentação (além do ápice dental); cirurgia perirradicular e reimplante de dentes avulsionados (Dajani *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998).

Abbott *et al.* (1990) advertem que, devido à dificuldade de garantir que toda a instrumentação vai estar confinada no interior do canal radicular, a profilaxia antibiótica deve ser recomendada para todos os pacientes de risco, durante a terapêutica endodôntica.

As condições cardíacas mais associadas à endocardite bacteriana são classificadas de acordo com a *American Heart Association*, em condições de alto risco e risco moderado. As condições cardíacas consideradas de alto risco são: válvulas cardíacas protéticas; endocardite bacteriana prévia; condutos pulmonares sistêmicos construídos cirurgicamente; e doenças cardíacas cianóticas complexas, como estados ventriculares simples, transposição de grandes artérias e tetralogia de Fallot. As de risco moderado compreendem: a maioria das malformações cardíacas congênitas; disfunção valvular adquirida; cardiomiopatia

hipertrófica; prolapso da válvula mitral com regurgitação valvular e/ou espessamento dos folhetos valvulares. Em ambas as condições, recomenda-se o regime antimicrobiano profilático para prevenção da endocardite bacteriana (Dajani *et al.* 1997; Andrade *et al.*, 1998).

Para Dajani *et al.* (1997) a endocardite infecciosa causada por *Streptococcus* do grupo viridans é mais comum após certas intervenções odontológicas do trato respiratório superior e do esôfago, não sendo comum que esses microrganismos causem complicações em procedimentos invasivos do trato gastro-intestinal e genito-urinário. Similarmente, segundo os autores, a endocardite provocada por *Enterococcus* spp. seria uma consequência de intervenções do trato gastro-intestinal, e não uma consequência comum dos procedimentos odontológicos. Para o uso correto da profilaxia antibiótica, um dos princípios básicos é o conhecimento dos principais microrganismos causadores da infecção e sua suscetibilidade antimicrobiana (Grad, 1997).

Streptococcus do grupo viridans são α - hemolíticos pertencem às espécies dos grupos dos *S. sanguis*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. salivarius*, *S. vestibularis* e “*Gemella* spp” (Gomes, 1995).

Nord & Heimdahl (1990) explicaram que a produção de dextrano, um polissacarídeo extra-celular, pelos *S. mutans* e *S. sanguis*, facilita a adesão na superfície do endocárdio, constituindo um fator de virulência na patogenicidade da endocardite.

O regime profilático padrão recomendado pela *American Heart Association* consiste em uma única dose de amoxicilina, por via oral. Os antibióticos amoxicilina, ampicilina e penicilina são igualmente efetivos, *in vitro*, contra os estreptococos α -hemolíticos; entretanto, a amoxicilina é recomendada porque é mais bem absorvida pelo trato gastrointestinal, proporcionando níveis séricos maiores e mais duradouros. A dose recomendada é de 2,0 g, para ser administrada 1 hora antes dos procedimentos dentais (Dajani *et al.* 1997; Andrade *et al.*, 1998).

Pacientes alérgicos às penicilinas (amoxicilina, ampicilina ou penicilina) devem ser tratados com regimes alternativos. A clindamicina é uma opção recomendada, administrada por via oral, 1 hora antes do procedimento, em uma dose de 600 mg. Azitromicina ou claritromicina também é uma alternativa para os pacientes alérgicos às penicilinas (Dajani *et al.* 1997). Essas drogas são relacionadas quimicamente à eritromicina, mas possuem um

nível sérico maior e mais prolongado, um espectro antibacteriano mais amplo, e causam menos efeitos adversos no trato gastrointestinal, quando comparados à eritromicina (Chambers & Sande, 1995; Andrade, 1999).

Segundo Dajani *et al.* (1997), a eritromicina não está mais incluída nas novas recomendações devido a efeitos adversos no trato gastrointestinal e a farmacocinética complicada das várias formulações.

Penicilinas

As penicilinas, como um grupo, são os agentes antimicrobianos mais freqüentemente utilizados, e constituem a primeira opção como coadjuvante no tratamento das infecções odontológicas leves ou moderadamente severas, e na prevenção da endocardite bacteriana (Greenberg *et al.*, 1979; Moenning *et al.*, 1989; Abbott *et al.*, 1990; Baker & Fotos, 1994; Sands *et al.*, 1995; Andrade, 1999).

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

Dajani *et al.* (1994) observaram, após a administração por via oral de uma única dose de 2g de amoxicilina, os picos plasmáticos da droga após 1, 2, 4 e 6 horas, e encontraram, respectivamente, 9,0; 14,5; 10,7 e 3,7 µl/ml. Os autores relataram que as concentrações obtidas eram maiores do que as concentrações necessárias para impedir o crescimento da maioria dos estreptococos da cavidade oral.

Devido à alta concentração e a níveis prolongados da droga no sangue, a amoxicilina é o agente de escolha para a profilaxia antibiótica em pacientes com risco de desenvolvimento da endocardite bacteriana (Dajani *et al.*, 1997).

As penicilinas fazem parte do grupo dos antibióticos beta-lactâmicos, devido à presença de um anel beta-lactâmico em sua estrutura química. Esses compostos possuem ação bactericida, e agem inibindo a síntese da parede celular (Walker, 1992; Andrade 1999).

O principal mecanismo de resistência de bactérias às penicilinas é a produção de beta-lactamases pelas células bacterianas. As beta-lactamases são enzimas que têm a

propriedade de destruir o anel beta-lactâmico de algumas penicilinas e a estrutura alterada da droga não permite a ligação com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular, impedindo sua ação bactericida (Walker, 1992; Forbes *et al.*, 1998; Andrade, 1999).

Staphylococcus são as bactérias Gram-positivas que mais comumente produzem beta-lactamases, inativando as penicilinas (Forbes *et al.*, 1998). Várias alterações na estrutura dos agentes beta-lactâmicos têm sido desenvolvidas para proteger o anel beta-lactâmico contra a hidrólise enzimática, aumentando a eficácia do antibiótico nos microrganismos produtores de beta-lactamases. As isoxazolil-penicilinas, que compreendem a oxacilina e dicloxacilina, são antibióticos de pequeno espectro, resistentes às beta-lactamases, indicados quase exclusivamente em infecções estafilocócicas (Walker, 1992; Forbes *et al.*, 1998; Andrade, 1999). Como os *Staphylococcus* não constituem os patógenos primários das infecções odontogênicas, essa droga não está indicada na maioria dos casos (Moening *et al.*, 1989).

Uma estratégia terapêutica é a associação de substâncias inibidoras das beta-lactamases às penicilinas. O clavulanato de potássio, sal potássico do ácido clavulânico, exerce uma ação inibitória das beta-lactamases, se unido irreversivelmente a estas enzimas e inativando-as, tornando o microrganismo sensível às penicilinas que normalmente eram susceptíveis à ação das beta-lactamases, aumentando assim de forma efetiva o espectro de ação antibiótica das penicilinas (Walker, 1992; Forbes *et al.*, 1998; Andrade, 1999).

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos também pode ser adquirida quando as bactérias alteram o alvo onde antibiótico vai agir. Nesse mecanismo, o microrganismo muda, ou adquire de outro microrganismo, os genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular. Essas novas enzimas, derivadas de mutações genéticas, continuam sua função mesmo na presença do antibiótico beta-lactâmico, geralmente porque esses não apresentam afinidade suficiente por essas enzimas. Esse é o mecanismo pelo qual espécies de *Staphylococcus* podem apresentar resistência às penicilinas (ao grupo das penicilinas resistentes às beta-lactamases) e a outros agentes beta-lactâmicos. Esse mecanismo também é responsável pela resistência aos beta-lactâmicos observadas entre espécies de *Enterococcus* e algumas espécies de *Streptococcus pneumoniae* e estreptococos *viridans* (Forbes *et al.*, 1998).

Segundo o Conselho de Assuntos Científicos da ADA (*American Dental Association*), em sua reunião em 1997, a resistência aos antibióticos tem aumentado em uma taxa alarmante. A resistência à penicilina de *Streptococcus pneumoniae* tem crescido de praticamente zero, há poucos anos atrás, a 25% a 60% de todas espécies isoladas. Essa resistência à penicilina tem aumentado também entre espécies de estreptococos *viridans*.

Hunt & Meyer (1983) coletaram espécimes de infecções odontogênicas no período de 1978 a 1981 e constataram que, em contraste com os resultados de 1978, onde não foi encontrada nenhuma espécie de estreptococos *viridans* resistente à penicilina, as últimas espécies isoladas no estudo apresentaram resistência à penicilina em aproximadamente 15% dos casos.

Baker *et al.* (1985) isolaram *Streptococcus mutans* resistentes às penicilinas da cavidade oral. Quayle *et al.* (1987) também encontraram resistência às penicilinas em espécies de estreptococos *viridans*, entre organismos isolados de infecções odontogênicas.

Estreptococos do grupo *viridans* requerem teste de suscetibilidade antimicrobiana quando implicam em risco de endocardites (Forbes *et al.*, 1998). Parillo *et al.* (1979) relataram dois casos em que estreptococos *viridans* resistentes às penicilinas produziram endocardites em pacientes que receberam o regime profilático com estas drogas.

Hsieh (2000) estudaram 96 isolados clínicos hospitalares de enterococcus coletados no ano de 1998. Todas as amostras foram suscetíveis a vancomicina. A mesma porcentagem de resistência foi encontrada na penicilina e ciprofloxacina (3.1%).

Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico com lesão periapical persistente. Todas as amostras foram suscetíveis às penicilinas “*in vitro*”, sendo a concentração inibitória mínima (CIM) da amoxicilina e amoxicilina com ácido clavulânico (CIM₉₀ = 0,75 µg/mL⁻¹).

Kaçmaz & Aksoy (2005) estudaram a suscetibilidade de 264 isolados clínicos de enterococcus na Turquia, sendo 78% *E. faecalis*, 9% *E. faecium* e 12% *Enterococcus* spp. No total de amostras testadas a resistência à penicilina e à ampicilina foi de 27% e 26%, respectivamente. Nenhuma amostra foi resistente à vancomicina.

Delboni (2006) estudou a suscetibilidade antimicrobiana de *E. faecalis* isolados no insucesso endodôntico, e verificou que todas as espécies foram suscetíveis à amoxicilina + ácido clavulânico, 87,5% a amoxicilina e a moxifloxacina e 60% à ciprofloxacina.

Estreptococos resistentes às penicilinas podem estar presentes na cavidade oral de pacientes que fazem uso constante das penicilinas, como nos casos de prevenção da febre reumática aguda. De acordo com as recomendações da *American Heart Association*, nessas situações deve-se selecionar uma droga de um outro grupo, como a clindamicina, azitromicina ou a claritromicina para a profilaxia da endocardite bacteriana (Dajani *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998).

Macrolídeos

Os macrolídeos são um grupo de antibióticos que possuem em comum, na sua estrutura química um anel lactônico de 15 átomos. Este grupo inclui a eritromicina e outras drogas relacionadas quimicamente com a eritromicina, como a claritromicina e roxitromicina (Andrade, 1999). A azitromicina difere dessas drogas pela inserção de apenas um átomo de nitrogênio no anel lactônico de 15 átomos, o que parece conferir a essa droga mudanças em algumas características farmacocinéticas, como uma meia-vida plasmática biológica bastante prolongada nos tecidos, e um maior espectro de ação (Chambers & Sand, 1995; Andrade, 1999). Os macrolídeos são bacteriostáticos e agem inibindo a síntese proteica bacteriana, através da ligação às subunidades 50S dos ribossomos (Walker, 1992; Andrade, 1999).

A eritromicina apresenta espectro de ação similar ao das penicilinas G e V, com ação contra a maioria dos cocos Gram-positivos e a maioria das bactérias anaeróbias orais (Moenning *et al.*, 1989; Sands *et al.*, 1995). Porém, muitas bactérias anaeróbias e aeróbias têm desenvolvido resistência a essa droga (Baker *et al.*, 1993; Cullmann *et al.*, 1993).

A maioria das bactérias Gram-negativas apresenta resistência intrínseca a eritromicina devido à sua incapacidade de penetrar o complexo: membrana externa e parede celular. A resistência adquirida pode ser mediada por plasmídeos que codificam uma alteração no sítio de ligação na subunidade 50S ou por enzimas que inativam a eritromicina (Walker, 1992).

Baker *et al.* (1993) isolaram 139 amostras bacterianas da cavidade oral, anaeróbias estritas e facultativas, e testaram a suscetibilidade bacteriana a diversos antibióticos. Os resultados demonstraram que praticamente todos os grupos bacterianos continham espécies resistentes a eritromicina, compreendendo espécies de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides oralis*, *Campylobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*.

Hunt *et al.* (1978) relataram que aproximadamente 50% das espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus* isoladas de infecções orais, eram resistentes a eritromicina. Segundo Chambers & Sand (1995), embora não sejam comuns a todas as localidades, as espécies de *Streptococcus* resistentes a eritromicina parecem estar aumentando, e freqüentemente também apresentam resistência a clindamicina.

A azitromicina devido a sua diferença estrutural apresenta um espectro de ação aumentado quando comparado a eritromicina (Chambers & Sand, 1995; Andrade, 1999). Segundo Fass (1993), a azitromicina é menos ativa que a eritromicina contra os organismos Gram-positivos, especialmente *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. As duas drogas apresentam atividade equivalente contra *Staphylococcus* spp. e bactérias anaeróbias Gram-positivas. O autor verificou que embora a atividade antibacteriana dessas duas drogas variasse entre microrganismos, como regra geral, os microrganismos que eram relativamente suscetíveis a um eram suscetíveis ao outro, assim como microrganismos resistentes a um, também apresentavam resistência-cruzada ao outro; com exceção do *Fusobacterium*, que se mostrou suscetível somente a azitromicina.

Peters *et al.* (1992), em uma revisão da literatura sobre a atividade antimicrobiana da azitromicina e de outros macrolídeos, relataram que embora a azitromicina apresentasse menor atividade do que a eritromicina *in vitro* contra os microrganismos Gram-positivos, clinicamente, as concentrações da azitromicina nos tecidos eram superiores a da eritromicina. Após a administração oral, as concentrações sanguíneas da azitromicina são menores que a eritromicina, porém isso reflete a rápida movimentação da droga da circulação para os compartimentos intracelulares, resultando em uma maior concentração tissular do que a comumente vista com a eritromicina. Entretanto, a desvantagem potencial da baixa concentração sanguínea da azitromicina está relacionada a bacteremia que pode ocorrer em pacientes que estão comprometidos severamente. Contudo, a concentração

tissular é mais importante que a sérica para o tratamento de doenças do trato respiratório e outras infecções (Peters *et al.*, 1992).

Segundo Andrade (1999), ainda não existe um número suficiente de trabalhos na área odontológica que permita avaliar a relação risco/benefício da azitromicina no tratamento das infecções odontológicas.

Dahlén *et al.* (2000) determinaram a suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de 29 cepas de enterococcus isoladas em infecções endodônticas que estavam sob tratamento com Ca(OH)_2 . As cepas apresentaram-se resistentes aos antibióticos: benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina. Porém, as mesmas foram sensíveis a eritromicina e a vancomicina.

Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana dos *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico. Todas as amostras foram suscetíveis às penicilinas, entretanto a eritromicina e azitromicina foram às menos efetivas. Do mesmo modo, Delboni (2006) estudou a suscetibilidade antimicrobiana de 8 espécies de *Enterococcus faecalis* isoladas de canais com insucesso endodôntico, que também apresentaram resistência bacteriana frente aos antibióticos eritromicina e azitromicina.

Testes de suscetibilidade antimicrobiana

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 Steenberghe *et al.*, 1993; Rosenblatt & Brook, 1993; Wexler 1993; Barnard *et al.*, 1996; Forbes *et al.*, 1998).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana estão indicados, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS*, nas seguintes situações: determinação do padrão de suscetibilidade dos microrganismos a novos agentes antimicrobianos; monitoramento periódico dos padrões de suscetibilidade de bactérias dentro de uma área geográfica ou centro de saúde; auxílio ao tratamento de pacientes em casos de fracasso de terapêutica ou infecções persistentes, em casos da presença de uma

espécie resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados, na ausência de uma terapêutica comprovada para uma infecção em particular e da severidade da infecção (Finegold *et al.*, 1988).

Testes de suscetibilidade geralmente consistem na avaliação da atividade direta do agente antimicrobiano sobre a bactéria, que são colocados juntos em um mesmo meio *in vitro* para verificar a viabilidade da bactéria na presença de um determinado medicamento em uma determinada concentração (Forbes *et al.*, 1998). Os métodos mais utilizados são os testes de suscetibilidade convencionais como a diluição em caldo (Barnard *et al.*, 1996), a diluição em ágar (Baker *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1989; Abu-fanas *et al.*, 1991) e o método da difusão de discos em ágar (Zeldore *et al.*, 1962); e os testes de suscetibilidade comerciais, que são variações dos métodos convencionais de diluição (Cullman *et al.*, 1993) e difusão (Citron *et al.*, 1991; Ngui-Yen *et al.*, 1992; Olsson-Lijequest, 1992; Brown, 1992; Bolmström, 1993; Conti, 1997; Le Goff *et al.*, 1997; Vigil *et al.*, 1997).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são usados para determinar a concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento do microrganismo *in vitro*. A menor concentração da droga capaz de inibir o microrganismo é denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (Walker, 1992).

Baseado nos critérios estabelecidos pelo NCCLS, quando a CIM do medicamento testado é determinada para uma bactéria em particular, esta pode ser classificada como suscetível, suscetibilidade intermediária ou resistente. Esses critérios de interpretação são resultados de estudos que correlacionam a CIM com o nível sérico atingido para cada agente antimicrobiano, mecanismos de resistência e sucesso da terapia. Portanto, se o microrganismo é inibido pela concentração do agente antimicrobiano que pode ser atingida no sangue ou tecidos do paciente que toma as doses recomendadas, o microrganismo é suscetível àquela medicação. Se a concentração do agente antimicrobiano requerida para inibição de um microrganismo é maior que a obtida no sangue e tecidos durante a terapia, o microrganismo é resistente. E se a concentração inibitória é igual ou ligeiramente maior do que aquela normalmente obtida no sangue, o microrganismo apresenta uma suscetibilidade intermediária à medicação (Forbes *et al.*, 1998). Porém, segundo Chambers & Sande (1995), os testes de suscetibilidade antimicrobiana apresentam suas limitações, pois a

concentração inibitória mínima (CIM) no plasma não reflete a concentração do antibiótico no sítio de infecção.

O teste de suscetibilidade comercial E-test foi desenvolvido combinando a conveniência e praticidade do método do disco com a habilidade de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (Bolmström, 1993).

O E-test consiste em uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 3mm 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 é colocada sobre uma placa de ágar, previamente inoculada com a bactéria a ser estudada, propiciando a difusão de um gradiente de antibiótico. Após o período de incubação, uma zona elíptica de inibição é formada; o ponto de interseção da borda da zona de inibição com a escala numérica da fita, referente à concentração da droga representam a CIM. A fita do E-test pode detectar uma CIM que varia de 0,016 a 256 µg/ml, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993).

O E-test constitui um método simples de realizar e fácil de interpretar para se testar a suscetibilidade antimicrobiana (Citron *et al.*, 1991; Ngui-Yen *et al.*, 1992; Olsson-Liljequist, 1992; Brown, 1992; Bolmström, 1993; Conti 1997; Le Goff *et al.*, 1997; Vigil *et al.*, 1997). Para a maioria das combinações antibiótico-bactéria, a elipse formada é clara, com a CIM bem definida (Citron *et al.*, 1991; Bolmström, 1993).

O E-test é considerado um método eficaz para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (Olsson-Liljequist, 1992; Brown, 1992; Ngui-Yen *et al.*, 1992).

Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções endodônticas

Se um microrganismo é clinicamente importante, é preciso conhecer quais as chances dele ser resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados para erradicá-los, ou seja, as drogas de escolha. Segundo Forbes *et al.* (1998), a crescente disseminação de resistência entre as bactérias clinicamente importantes tem diminuído a lista de bactérias cuja suscetibilidade antimicrobiana possa ser predita com confiança baseada apenas na identificação, sem a necessidade de realizar testes. A resistência

adquirida a vários agentes antimicrobianos explica a necessidade da realização de testes de suscetibilidade em todas bactérias isoladas clinicamente significantes, incluindo diversos grupos, gêneros e espécies. Bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, comumente requerem testes de suscetibilidade antimicrobiana (Forbes *et al.*, 1998).

As infecções persistentes do gênero *Enterococcus* se deve à sua resistência intrínseca a vários antibióticos utilizados comumente, e, talvez, mais importante ainda seja sua habilidade de adquirir resistência aos antibióticos empregados atualmente, seja por mutação ou recebendo material genético estranho através de plasmídeos e transposons. Os enterococos apresentam resistência intrínseca e moderadas concentrações de aminoglicosídeos, o que ocorre em todas as espécies e decorre de uma baixa penetração do antimicrobiano pela parede bacteriana. A resistência adquirida a altas concentrações dos antibióticos aminoglicosídeos é devida ou a mutações resultando na diminuição da ligação do agente ao ribossomo, como a que ocorre com a estreptomicina (chamada resistência ribossômica), ou, mais comumente, à aquisição de novos genes que codificam enzimas que modificam os aminoglicosídeos, a chamada resistência adquirida (Teixeira & Facklam 2003).

Zeldore & Ingle (1962), estudando a sensibilidade antimicrobiana de bactérias facultativas isoladas do canal radicular, testaram a suscetibilidade, através do método do disco, de espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, utilizando os seguintes antibióticos: penicilina, eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol. Os resultados demonstraram que 32,4% dos *Staphylococcus* eram resistentes à penicilina e 24,3% à tetraciclina. Em geral, os *Streptococcus* foram sensíveis aos antibióticos estudados, enquanto os *Enterococcus* foram resistentes à penicilina em 83% dos casos e a tetraciclina em 33%. Todos microrganismos estudados foram sensíveis à eritromicina e ao cloranfenicol.

Engström (1964), testando a suscetibilidade de 68 amostras de *Enterococcus* isolados de infecções endodônticas, através do método do disco, verificou que esse microrganismo foi sensível a eritromicina, porém apresentou resistência a penicilina em 6% dos casos. Das amostras de *Enterococcus* que foram sensíveis a penicilina, poucas espécies

eram eliminadas com dosagens normais, sendo necessárias altas dosagens do antibiótico para o tratamento de infecções generalizadas.

Miranda (1969) avaliou a suscetibilidade antimicrobiana de espécies resistentes ao preparo químico-mecânico durante o tratamento endodôntico, através do método do disco. Observou-se uma predominância de bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*. As bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* foram as mais resistentes, apresentando praticamente 90% das espécies resistentes à penicilina, enquanto os *Streptococcus* apresentavam 24%.

Nord & Wadström (1973) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de espécies de *Enterococcus* isoladas de pacientes com periodontites apicais e pulpites. As amostras foram identificadas como *Enterococcus faecalis* e a suscetibilidade antimicrobiana dessas espécies foi testada através do método de diluição em ágar. A concentração inibitória mínima da ampicilina (0.5 – 2.0 µg/ml) foi menor que a da benzilpenicilina (1.0 – 4.0 µg/ml) e fenoximetilpenicilina (2.0 – 8.0 µg/ml) para todas as espécies testadas. A maioria das espécies testadas foi sensível a eritromicina, porém havia uma grande variação no grau de suscetibilidade das bactérias a essa droga (0.5 - >128 µg/ml), com o aparecimento de espécies resistentes. A concentração inibitória mínima de drogas do grupo das lincosaminas variava entre 8 e >128 µg/ml, sendo portanto, *Enterococcus* altamente resistentes às lincosaminas. Os autores concluíram que a ampicilina foi mais efetiva do que a penicilina contra o *Enterococcus faecalis*, e que a eritromicina e a lincosamina apresentavam um uso limitado devido à presença de espécies resistentes.

Heintz *et al.* (1975) estudaram, através do método do disco, a sensibilidade antimicrobiana de 50 espécies de *Enterococcus* spp. que persistiram no canal após preparo químico-mecânico e medicação intracanal. Todas as espécies testadas foram sensíveis a ampicilina e a vancomicina. Mais de 90% das espécies foram sensíveis a eritromicina. Todos os microrganismos foram parcialmente ou totalmente resistentes à penicilina e a clindamicina.

Hunt *et al.* (1978) analisaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de exsudatos de infecções odontogênicas agudas em 74 pacientes atendidos na Universidade de Emory, EUA, no período entre 1973 e 1976. Espécies de “*Streptococcus viridans*”, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus*,

Enterococcus, *Lactobacillus* e “*Bacteroides*” foram testadas através do método do disco, utilizando ampicilina, cefalotina, eritromicina e penicilina. Todas as espécies de *Streptococcus* isoladas foram suscetíveis à ampicilina, cefalotina e penicilina. Entretanto, aproximadamente 50% das espécies de “*Streptococcus viridans*” foram resistentes a eritromicina. Dentre as espécies de *Staphylococcus aureus* isoladas, 20% foram resistentes à ampicilina e à penicilina, e cerca de 50% foram resistentes à eritromicina.

Matusow (1981) analisou a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados de 78 canais radiculares de dentes com abscessos dento-alveolares agudos. Do total de 105 microrganismos isolados, 82 eram aeróbios e anaeróbios facultativos, cuja sensibilidade antimicrobiana foi testada através do método do disco. Dentre essas bactérias, somando-se as espécies sensíveis e de sensibilidade intermediária aos antibióticos testados, 73 espécies se apresentaram suscetíveis à eritromicina; 72 à ampicilina; 67 à penicilina e 59 à clindamicina. A eritromicina apresentou eficácia moderada, sendo ativa contra 19 espécies. No presente estudo, o gênero *Streptococcus* foi o mais predominante, e o *Enterococcus* o mais resistente. Dentre as espécies de *Enterococcus*, 59,7% foram resistentes a clindamicina, 21,5% resistentes a penicilina e a ampicilina, enquanto nenhuma resistência foi apresentada com a eritromicina.

Stern *et al.* (1990) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas após o preparo químico-mecânico de canais radiculares. Os autores revelaram que a maioria das culturas positivas era representada por monoinfecções (92,19%), e as espécies mais frequentemente isoladas pertenciam ao gênero *Streptococcus*, principalmente espécies de “*Streptococcus viridans*” (α -hemolíticos) e *Streptococcus* do grupo D de Lancefield (*Enterococcus*). A suscetibilidade antimicrobiana dessas espécies foi testada utilizando o método do disco. Das espécies de “*Streptococcus viridans*” (α -hemolíticos) estudadas, 97,9% foram sensíveis à ampicilina, 93,7% à penicilina e 85% à eritromicina. Entre as espécies de *Enterococcus*, 92,8% foram sensíveis à ampicilina, 36,1% à penicilina e 61,9% à eritromicina. O estudo foi realizado entre o ano de 1981 e 1987 e os autores relataram que não houve uma mudança significativa no padrão de suscetibilidade das bactérias no período estudado.

Vigil *et al.* (1997) estudaram o padrão de suscetibilidade de microrganismos isolados de 28 lesões periapicais persistentes ao tratamento endodôntico. Os

microrganismos mais comumente isolados foram: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, “*Wolinella recta*”, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp. Os autores utilizaram o E-test para avaliar a suscetibilidade dessas bactérias e concluíram que os resultados encontrados não deixaram evidências claras de resistência antibiótica significativa entre as cepas testadas.

Dahlén *et al.* (2000) identificaram espécies de enterococcus em 29 infecções endodônticas que estavam sob tratamento com Ca(OH)_2 . *E. faecalis* foram encontrados em 26 casos, e *E. faecium* foi detectado em apenas 3 casos. Foi determinada a suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* das 29 cepas de enterococcus isoladas, as quais apresentaram se resistentes aos antibióticos: benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina. As cepas foram também sensíveis a eritromicina e a vancomicina. Devido a sua baixa sensibilidade aos agentes antimicrobianos, os enterococcus podem sobreviver a terapia endodôntica o que pode contribuir para o insucesso do tratamento.

Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico com lesão periapical persistente. Todas as amostras foram suscetíveis às penicilinas “*in vitro*”, mas a concentração inibitória mínima (CIM) da amoxicilina e amoxicilina com ácido clavulânico ($\text{CIM}_{90} = 0,75 \mu\text{g/mL}^{-1}$) foi menor que a benzilpenicilina ($\text{CIM}_{90} = 3,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Todas as cepas foram também suscetíveis à vancomicina e moxifloxacina, sendo que 95,2% das cepas foram suscetíveis ao cloranfenicol. Entre os isolados 85,7% eram suscetíveis à tetraciclina e doxiciclina e 80,9% à ciprofloxacina. A CIM da eritromicina variou de 0,38 para $>256 \mu\text{g/mL}^{-1}$, apenas 28,5% das amostras foram suscetíveis ($\text{CIM} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$). A azitromicina apresentou suscetibilidade baixa (14,2%). Concluíram que *E. faecalis* foram totalmente suscetíveis “*in vitro*” à amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, vancomicina e moxifloxacina. A maioria das cepas foram também suscetíveis ao cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacina.

Sedgley *et al.* (2005) estudaram em 33 cepas de *Enterococcus* spp. endodônticos evidências fenotípicas através do teste de suscetibilidade antimicrobiana. Cinco cepas foram resistentes à tetraciclina e uma à gentamicina, sendo todas as outras suscetíveis à ampicilina, benzilpenicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, rifampicina, estreptomina e vancomicina.

Delboni (2006) estudou a suscetibilidade antimicrobiana de 8 espécies de *Enterococcus faecalis* isoladas de 30 canais com insucesso endodôntico, e encontrou que as espécies estudadas foram 100% suscetíveis à amoxicilina + ácido clavulânico, 87,5% a amoxicilina e a moxifloxacina e 60% à ciprofloxacina. Entretanto resistência bacteriana foi verificada entre espécies do gênero *Enterococcus* frente aos antibióticos eritromicina e azitromicina.

Reynaud *et al.* (2006) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de 59 cepas de *E. faecalis* isolados de canais infectados de pacientes da Finlândia e Lituânia. Foi encontrada uma alta prevalência de resistência à rifampicina, como também à penicilina e ampicilina. Entretanto, vancomicina e gentamicina não apresentaram resistência. Concluíram que mesmo havendo diferença nos antibióticos de escolha nos dois países, as cepas de *E. faecalis* mantiveram padrões de suscetibilidade semelhantes.

Chai *et al.* (2007) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana do biofilme de *E. faecalis* num modelo de filtro de membrana. Biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) com 2 dias foram expostos a alguns antibióticos como também Ca(OH)₂ mostraram que apenas a eritromicina, a oxitetraciclina e o Ca(OH)₂ eliminaram 100% do biofilme, sendo que a ampicilina, a vancomicina e a vancomicina seguida da gentamicina foram ineficazes.

Métodos Moleculares - PCR (Polimerase Chain Reaction)

A maioria dos estudos da microbiota de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais foi realizada através da coleta microbiológica dos canais radiculares e identificação bacteriana pelo método de cultura (Engström 1964; Möller 1966; Molander *et al.* 1998; Sundqvist *et al.* 1998; Pinheiro *et al.* 2003a,b; Gomes *et al.* 2004). Todos estes estudos apresentaram uma porcentagem de culturas negativas, refletindo a dificuldade da coleta microbiológica dos canais radiculares durante o retratamento endodôntico (Sundqvist *et al.*, 1998). Nestes casos, um número de células bacterianas pode ser perdido durante os procedimentos de remoção do material obturador. Conseqüentemente 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 genéticos moleculares, em especial o PCR

(Polymerase Chain Reaction), para identificar bactérias dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio (Rolph *et al.*, 2001; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças, 2004; Gomes *et al.*, 2006). Esses métodos se baseiam na detecção do DNA das espécies bacterianas sendo, portanto, mais sensíveis do que o método de cultura, além de poder identificar cepas de cultivo difícil (Siqueira, 2001).

Rolph *et al.* (2001) estudaram a microbiota de canais com polpas necrosadas e com tratamento endodôntico prévio utilizando métodos moleculares e cultura. Os autores relataram que houve um maior número de resultados positivos pelo método do PCR do que pela cultura, especialmente em casos de retratamento. A análise molecular de 5 casos de infecções persistentes revelaram espécies dos gêneros *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Pepstreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, *Veillonella*. *Enterococcus* não foram isolados nos 5 casos estudados.

Siqueira & Rôças (2003) investigaram a presença de *Propionibacterium propionicum* e *Actinomyces radicidentis* em infecções endodônticas primárias e persistentes pelo método do PCR. *P. propionicum* estava presente em 36% das amostras de infecções primárias em 58% das amostras de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais. Por sua vez, *A. radicidentis* estava presente respectivamente, em 4% e 8% das infecções endodônticas primárias e persistentes.

Siqueira & Rôças (2004) investigaram a ocorrência de 19 espécies microbianas, pela análise do PCR, em 22 amostras de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Todas as amostras foram positivas a pelo menos uma das seguintes bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* ou *Propionibacterium propionicum*. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77% dos casos. As outras espécies mais isoladas foram: *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48 %) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi isolada em 9% das amostras.

Utilizando o PCR, Rôças *et al.* (2004) investigaram a prevalência de *Enterococcus faecalis* em canais não tratados e em canais com tratamento endodôntico prévio associado a lesões periapicais crônicas. *Enterococcus faecalis* foi isolado em 67% (20/30) dos dentes

com insucesso do tratamento endodôntico e em 18 % (9/50) dos casos de infecções primárias, sendo isolados principalmente em dentes assintomáticos.

Gomes *et al.* (2006) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em canais com polpas necrosadas e em canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico, utilizando a cultura e o PCR. Nos 50 casos de insucesso endodôntico, *E. faecalis* estava presente em 21 (42%) casos pela cultura, e em 38 (76%) casos pela análise do PCR das mesmas amostras. Por outro lado nos 50 casos de infecções primárias, *E. faecalis* estava presente em 2 (4%) e 41 (82%) canais, respectivamente, pela cultura e PCR. Esses resultados mostraram que *Enterococcus faecalis* pode estar presente em canais com polpas necrosadas, porém em quantidades bem pequenas, não detectáveis pelo método de cultura. Segundo os autores, o crescimento dessa espécie bacteriana pode ser favorecido por mudanças ecológicas no canal radicular após o preparo químico-mecânico ou obturação deficiente do canal radicular, tornando possível sua detecção nas culturas microbiológicas de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Gomes *et al.* (2008) identificaram através de PCR a presença de 9 espécies microbianas em 45 canais radiculares com insucesso endodôntico. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente (78%), seguido dos *Peptostreptococcus micros* (51%), *Porphyromonas gingivalis* (35%), *Porphyromonas endodontalis* (22%), *Prevotella intermedia* (11%) e *Prevotella nigrescens* (11%). Além disso, PCR detectou *Filifactor alocis* em 26,7%, *Treponema denticola* em 24,4% e *Tannerella forsythia* em 4,4% das amostras. *T. denticola* e *P. micros* foram associados a dor à percussão ($p < 0.05$). *P. nigrescens* foi associado com a presença de dor espontânea e abscesso ($p < 0.05$). *P. endodontalis* e *P. nigrescens* foram associados com exudato purulento ($p < 0.05$). O sinergismo bacteriano também foi observado em algumas espécies.

Rôças *et al.* (2008) avaliaram a presença de 28 bactérias em dentes tratados endodonticamente apresentando lesões periapicais em pacientes alemães. Usaram PCR para detectar *E. faecalis* e *Candida albicans*. DNA bacteriano foi observado em todas as amostras. Os microrganismos mais frequentemente detectados foram *Streptococcus* (47%), *Lactobacillus* (35%), *Dialister invisus* (29%), *Eubacterium infirmum* (29%), *Prevotella intermedia* (29%), *Selenomonas sputigena* (29%), Synergistes oral clone BA121 (29%) e *Treponema denticola* (29%). O método PCR detectou 47% de *E. faecalis* e 6% de *Candida*

albicans. A maioria dos casos apresentaram mais de uma espécie de microrganismos, não sendo o *E. faecalis* a espécie mais dominante. Muitas outras espécies foram detectadas e por isso iniciou-se um questionamento sobre o envolvimento do mesmo nas infecções secundárias.

Sakamoto *et al.* (2008) detectaram 74 espécies pertencentes a 6 diferentes filos, dentro dos 9 casos de insucesso endodôntico estudados através de métodos moleculares. Destes, 55% foram identificados como filotipos não-identificados, os quais compunham uma significativa parte da microbiota. Outros 25 novos filotipos foram identificados. As maiorias dos casos tinham muitas espécies, com uma média de 10 por canal. Apenas 11 espécies foram detectadas em mais de 1 caso, revelando uma alta variabilidade na composição da microbiota. O estudo descobriu novos patógenos endodônticos incluindo bactérias ainda não-identificadas e espécies, diferentes de *E. faecalis*, que podem estar participando da etiologia do insucesso do tratamento endodôntico.

Fatores de Virulência microbiana

As substâncias produzidas pelos microrganismos que podem causar dano ao hospedeiro, por exemplo: toxinas bacterianas, são referidas como fatores de virulência. O termo passou a significar qualquer componente do microrganismo que seja exigido para provocar doença ou potencialize sua capacidade para isso (Schaechter *et al.*, 1999). De acordo com essa definição ampliada, mesmo uma substância que, purificada, não seja tóxica para o tecido do hospedeiro seria considerada um fator de virulência se, em sua ausência, o microrganismo se tornasse consideravelmente menos capaz de provocar doença (menos virulento). Desta definição estão excluídos os genes e produtos de genes, essenciais ao crescimento normal do microrganismo. Assim, um fator necessário para o crescimento de uma bactéria em meio de cultura em laboratório, não é considerado um fator de virulência, ao contrário de um fator que aumente a capacidade da bactéria em invadir a corrente sanguínea de seres humanos. Os fatores de virulência, hoje, podem ser facilmente estudados pela abordagem genética (Schaechter *et al.*, 1999).

Enterococcus faecalis é uma das principais espécies bacterianas encontrada normalmente no trato gastrointestinal e cavidade oral de seres humanos e animais. Esta espécie tem emergido como um importante patógeno envolvido em uma variedade de

infecções bacterianas como infecções urinárias, endocardites, bacteremia e em feridas e por analogia, tem sido relacionadas às cepas de origem endodôntica. Diversos estudos realizados em países desenvolvidos têm identificado um número crescente de determinantes de virulência, entretanto pouco se sabe a cerca da distribuição destes fatores no Brasil bem como sua participação no mecanismo de patogenicidade.

Enterococos têm um potencial crescente como agente de sérias infecções, como patógenos nosocomiais, e isso pode ser atribuído, em parte, à habilidade natural de adquirir plasmídeos, ou seja, elementos extra cromossômicos que codificam características que permitem a sobrevivência ou vantagens quanto ao crescimento destes microrganismos em ambientes não usuais e/ou estressantes como o canal radicular de dentes tratados endodônticamente. Linhagens mais virulentas podem ser resultantes da aquisição de genes pela troca genética, ilhas de patogenicidade em várias espécies codificando toxinas, fatores de adesão e outros fatores associados à virulência; fago conversão para produção de toxinas; e ainda, aquisição de fatores de virulência em plasmídeos e transposons (Mundy *et al.*, 2000). Características que determinam virulência são, entre outros: a aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória e secreção de produtos tóxicos (Eaton & Gasson, 2001).

Entre os fatores de virulência mais conhecidos em enterococos está a resistência intrínseca a antibióticos comumente usados no tratamento da doença e, ainda, outros fatores de virulência também podem ser adquiridos por trocas genéticas, como por exemplo: substância de agregação (*asa*), gelatinase (*gelE*), proteína de superfície de enterococos (*esp*), citolisina e adesinas, que facilitam sua resistência a antibióticos, agressão e adesão aos tecidos.

Gelatinase (*gelE*)

Gelatinases são peptidases extracelulares capazes de hidrolisar a gelatina, o colágeno e outras proteínas (peptídeos) (Makinen *et al.* 1989, Su *et al.*1991). Elas são produzidas por um grande número de *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados ou com endocardite. O teste da gelatinase verifica se os microrganismos em meio de cultura são capazes de apresentar atividade gelatinolítica em presença de gelatina como substrato. Os ensaios de produção de gelatinase são realizados nos meios de cultura e as amostras de

E. faecalis produtoras de gelatinase apresentam um halo de degradação ao redor das colônias.

O gene *gelE* codifica uma metaloendopeptidase extracelular, também chamada de gelatinase, que é uma enzima, que hidrolisa a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos (Vergis *et al.*, 2002). A gelatinase produzida por *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* teve a seqüência de seu gene determinada por Su *et al.*, em 1991. Foi encontrada uma homologia significativa desta com as proteinases de espécies de *Bacillus* e elastase de *Pseudomonas aeruginosa* (Su *et al.*, 1991).

Eaton e Gasson (2001) pesquisaram os fatores de virulência em enterococos isolados de espécimes clínicos humanos, em enterococos que são utilizados como probióticos em alimentos. O gene *gelE* foi encontrado em amostras que não apresentavam a atividade de gelatinase, ou seja, haviam os genes, mas eles não eram expressos. Esses genes foram denominados genes silenciosos ou dormentes e foram encontrados em todos os tipos de amostras, tanto nas isoladas de materiais clínicos quanto nas isoladas de alimentos. Estes genes se tornam ativos por alguns fatores ambientais, como por exemplo, o ambiente encontrado no trato gastrointestinal, o equilíbrio do microrganismo na microbiota intestinal e efeitos de sinergismo bacteriano, assim como, a presença e persistência de um grande número de enterococos viáveis (Eaton & Gasson, 2001). No entanto, em estudo realizado por Quin *et al.* (2000), genes reguladores designados *fsr* foram encontrados em *E. faecalis*, os quais regulam positivamente a expressão do gene *gelE* e *sprE* (gene da protease serina). A ausência destes genes ou a presença de uma mutação em um ou mais destes três genes, pode comprometer a expressão da gelatinase.

Substância de agregação

O sistema de conjugação envolvendo trocas de plasmídeo e *transposons* é freqüente entre os enterococos e contribuem para: trocas de genes de resistência e de genes fatores de virulência (Clewel *et al.*, 2002). A linhagem doadora exposta a ferormônios sexuais bacterianos são induzidas a sintetizar uma proteína de superfície específica codificada por plasmídeos denominada "Substância de Agregação" (Agg). Os genes que codificam a Agg são: *asa1*, *asc10*, *asa 373* e *ash 701*. Agg atua como um importante componente do sistema

de troca genética em resposta a ferormônios bacterianos, pois promove um contato eficiente entre enterococos “doador-receptor” para facilitar a transferência do plasmídeo. Além do ferormônio, o soro humano também induz a produção da substância de agregação, sugerindo que células expressando esta substância formam, *in vivo*, agregações maiores que células que não a expressam. (Mundy *et al.*, 2000).

In vitro, a substância de agregação também promove ligação direta de *E. faecalis* em neutrófilos humanos, via receptores do complemento do tipo 3 e outros receptores na superfície do neutrófilo e, ainda, esta substância também parece promover a sobrevivência de da classe da subtilisina codificada pelo gene *cylA*, confere a atividade das subunidades *E. faecalis* em neutrófilos (Rakita *et al.*, 1999).

Ativador de citolisinas (*cylA*)

A citolisina é uma toxina hemolítica descrita recentemente em enterococos que aparece em até 60% de *E. faecalis* isolados de surtos (Mundy *et al.*, 2000). A citolisina produzida em *E. faecalis* possui atividade de bacteriocina, contra uma ampla faixa de bactérias Gram-positivas, e também lisa células, tanto procarióticas como eucarióticas, apresentando atividade hemolítica contra hemácias de cavalo, coelho e humano, porém não tem ação em hemácia de carneiro.

Estas características atribuídas à hemolisina são importantes pois além de causar a lise de hemácias humanas, existe também a ação bactericida, por ser uma bacteriocina, em relação a outras bactérias, facilitando a prevalência do enterococo no local de infecção.

O operon da citolisina consiste em um grupo de 8 genes: *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI*. Este operon pode ser encontrado em plasmídeos autotransmissíveis e induzíveis por feromônios e, também, pode ser encontrado na Ilha de Patogenicidade em *E. faecalis* descrita recentemente (Shankar *et al.*, 2002). A citolisina é heterodimérica, consistindo de uma subunidade grande (CylLL) e outra pequena (CylLS) que possuem resíduos de lantionina e são necessárias para atividade hemolítica e de bacteriocina. A clivagem de ativação final, a qual é acompanhada por uma protease serina da citolisina contra células eucarióticas e procarióticas (Coburn *et al.*, 1999). Portanto, sua produção depende da expressão de 5 genes: *cylLL* e *cylLS*, *cylM*, *cylB* e *cylA*. Estes genes são

adquiridos usualmente por plasmídeo e aumentam a virulência de *E. faecalis* em modelos animais (Coburn & Gilmore, 2003).

Adesinas de superfície dos *Enterococcus* (*esp*)

A proteína de superfície de enterococos foi descoberta em uma linhagem de *E. faecalis* que causou múltiplas infecções em um hospital nos Estados Unidos (Shankar *et al.*, 1999). Neste estudo pode-se concluir que *E. faecalis* isolados de infecções apresentaram, na maioria das vezes, o gene *esp* o qual codifica um potente determinante de virulência. 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). É provável que, se a bactéria for capaz de retrair a proteína de superfície, haja maior dificuldade da ação do sistema imunológico e isso seja agravado principalmente em condições adversas do paciente, por exemplo, se já houver deficiência do sistema imunológico (Shankar *et al.*, 1999).

A proteína *esp* confere aos enterococos a capacidade de produção de biofilmes. Toledo-Arana *et al.* (2001) e Tendolkar *et al.* (2004) associaram a presença de *esp* com a formação de biofilme. Waar *et al.* (2002) observaram que a proteína de superfície de *E. faecalis* é um possível fator de virulência porque aumenta o número de bactérias aderidas a materiais de drenagem biliar.

Adesinas de colágeno dos *Enterococcus* (*ace*)

Foi recentemente identificada uma proteína envolvida na aderência da bactéria às células do hospedeiro, pela ligação ao colágeno, a mesma é codificada pelo gene *ace*, sendo designada como adesina de colágeno de *E. faecalis* (*ace*). Esta adesina intercede na ligação ao colágeno, fibronectina e laminina da matriz extracelular do hospedeiro e parece executar

papel importante na patogênese da endocardite (Koch *et al.* 2004, Rich *et al.* 1999, Nallapareddy *et al.* 2000).

Estudos *in vitro* demonstraram que 5,6% das células de *E. faecalis* isoladas de processos de endocardite conseguiram se ligar a fibronectina em condições de ensaio pré-determinadas, sendo essa superior a ligação de bactérias Gram negativas como *E. coli* (0,9%) entretanto foi consideravelmente inferior as cepas de *S. aureus*, já que 56% de isolados também de processos de endocardite conseguiram ligar-se a fibronectina (Scheld *et al.* 1995).

Fatores de virulência dos *E. faecalis*

Segundo Sedgley *et al.* (2005), o papel dos enterococci associados às infecções endodônticas persistentes, ainda é duvidoso. Em seu estudo com 33 cepas de *Enterococcus* spp. endodônticos identificaram evidências genotípicas e fenotípicas de fatores de virulências potenciais, em especial, a produção de gelatinase e resposta a ferormônios. A produção de gelatinase foi observada nas cepas de *E. faecalis* (n= 23), assim como a produção de bacteriocina (n=14). As reações de PCR codificando *efaA*, *ace*, e *asa* foram detectadas em todas as amostras, já a *esp* foi detectada em 20 amostras e *cylA* em 6 amostras, por outro lado *asa373* não foi detectada. O gene da gelatinase (*gelE*) foi detectado em todos os *E. faecalis* isolados (n=31), mas não nas cepas de *E. faecium* (n=2) isoladas.

A alta prevalência de fatores de virulência em cepas de *E. faecalis* também foi investigada por Reynaud af Geijersstam *et al.* (2007) que analisaram amostras de 23 Lituanos e 35 Finlandeses (n=58) e detectaram determinantes virulentos como *esp* (26%), citolisina (15%), *ace* (95%) e *efaA* (100%). Embora não apresentassem diferenças estatísticas entre os grupos testados, o gene *gelE* (72%) e a produção de gelatinase (47%) foram detectados mais freqüentemente em Finlandeses.

Diferenciação de *E. faecalis* através de AP-PCR e REP-PCR

A técnica REP-PCR faz uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras complementares de sequências de DNA repetitivas muito conservadas e presentes em numerosas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram negativas e de várias bactérias Gram positivas. Foram identificadas três famílias de sequências repetitivas: as sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic elements*) com 35-40 pares de bases, as quais são conservadas em várias espécies bacterianas; as sequências ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus elements*) de 124-127 pares de bases, as quais contêm um elemento repetitivo central invertido altamente conservado e que estão localizados nas regiões extragênicas do genoma bacteriano e o elemento BOX de 154 pares de bases. O conjunto destas 3 técnicas designa-se genericamente por Rep-PCR. Os elementos repetitivos podem estar presentes em ambas as orientações e os iniciadores estão concebidos de forma a permitirem a síntese de DNA a partir da repetição invertida, nos REP e ERIC-PCR, e da subunidade boxA, nos BOX-PCR, amplificando assim regiões genômicas distintas localizadas entre os elementos repetitivos (Versalovic *et al.* 1991).

As sequências REP e ERIC foram inicialmente identificadas com base na informação proveniente do sequenciamento dos genomas de *Escherichia coli* e de *Salmonella typhimurium* (Hulton *et al.*, 1991), mas existem numerosas descrições da sua existência em outras espécies bacterianas. A sua amplificação por PCR pode ser feita com um único iniciador, com um par ou vários pares de iniciadores. A utilização em simultâneo destas técnicas aumenta o poder discriminatório da tipagem. Os resultados apresentam ainda uma boa correlação com os resultados de RFLP-PFGE, tendo, no entanto, menor poder discriminatório.

Versalovic *et al.* (1991) foram os pioneiros na literatura com os protocolos e primers utilizando o REP e o ERIC-PCR. O método de ERIC-PCR pode ser usado com eficiência na diferenciação de diferentes genomas através do “DNA fingerprint” (impressões do DNA) gerado. Elementos REP e ERIC têm sido altamente conservados em *E. coli* e *S. typhimurium* e neste mesmo estudo aparecem conservados também no reino eucarionte. Os autores sugerem que alguns mecanismos podem estar contribuindo para o grau de conservação evolucionária destes elementos repetitivos, ou seja, a seleção natural

pode estar contendo a variação nestas seqüências, pois estas podem representar partes de uma proteína fundamental para as replicações do DNA (Yang & Ames 1990); ou estas seqüências repetitivas se propagam sozinhas através da conversão genética (Higgins *et al.* 1991).

A técnica de AP-PCR (reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários) é uma modificação da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) que caracteriza-se pela utilização de iniciadores de seqüência arbitrária em ciclos, gerando um padrão de informações altamente ricas e reprodutíveis de fragmentos de DNA. Este padrão reflete diferenças inversamente proporcionais a similaridade entre dois genomas.

Mendes *et al.* (1999) avaliaram duas metodologias moleculares de tipagem, respectivamente, eletroforese em campo elétrico variável (PFGE) e reação em cadeia da polimerase com iniciadores arbitrários (AP-PCR). A metodologia de AP-PCR apresentou-se rápida e de fácil execução, por isso pode ser usada como método inicial de tipagem, enquanto a metodologia de PFGE, por seu maior poder discriminatório, pode ser usada nas cepas que não puderam ser discriminadas por AP-PCR, mas requer mais trabalho e apresenta maior custo.

3. PROPOSIÇÃO

- Identificar pelo método de cultura os microrganismos da face interna do material restaurador e dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico com lesões periapicais.
- Identificar pelo método de cultura *Enterococcus* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e enterobactérias na saliva de pacientes que possuíam dentes com insucesso endodôntico associados a lesões periapicais.
- Relacionar os achados clínicos e radiográficos com a presença de microrganismos específicos nos canais radiculares.
- Analisar a suscetibilidade antimicrobiana de espécies de *Enterococcus faecalis* isolados dos dentes com insucesso endodôntico utilizando o método E-test.
- Analisar os fatores de virulência das espécies de *Enterococcus faecalis* isoladas nos diferentes sítios da cavidade oral utilizando-se métodos moleculares, como a reação de PCR, para detecção da presença dos genes *esp*, *gelE*, *ace*, *asa*, *asa373*, *efaA* e também estudar as enzimas citolisina e gelatinase através dos métodos de cultura por hidrólise do agar sangue e do agar gelatina, respectivamente.
- Comparar a similaridade, através do perfil genético, das cepas de *E. faecalis* dos diferentes sítios utilizando os métodos Rep-PCR e AP-PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (Anexo I). Sisnep: 0007.0.167.000-07

Foram selecionados 42 pacientes adultos que apresentavam dentes com restaurações definitivas apresentando insucesso do tratamento endodôntico, através de lesão periapical visível radiograficamente, seguindo os seguintes critérios:

- Tratamento endodôntico prévio com no mínimo 4 anos ou presença de sinais e sintomas associados ao dente (e.g. dor à percussão).
- Ausência de fratura radicular.
- Ausência de história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos (mínimo de 6 meses).
- Ausência de doenças sistêmicas e doença periodontal.

Primeiramente foi realizada uma anamnese. Para cada paciente foram anotados: dados pessoais, história médica e história dentária (incluindo o tempo que foi realizado o tratamento endodôntico) condições clínicas do dente tratado endodonticamente, tais como, qualidade das restaurações, presença de coroas metálicas, cáries, fraturas; presença de fístula e edema. Foram realizados testes para verificar a dor à percussão, à palpação e a mobilidade dental, além da realização de sondagem periodontal.



Figura 1. Exemplos de casos clínicos selecionados para este estudo.

Na análise radiográfica (Fig.1), foram avaliados os seguintes aspectos:

- presença de imagem radiográfica sugerindo infiltrações nas restaurações;
- limite da obturação dos canais radiculares, que foram divididos em intervalos de 0-2 mm, 3-5 mm, > 5 mm do ápice e sobre-obturados;
- qualidade do tratamento: considerado bom quando a guta-percha estava bem condensada e radiograficamente não se observava áreas radiolúcidas na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, com limite da obturação entre 0-2 mm do ápice e sem espaço vazio entre o pino e a obturação. Considerado em ruim quando: havia a presença de falhas radiolúcidas na obturação, indicando um selamento deficiente ou espaços vazios entre o pino e a obturação ou com limite da obturação maior que 2 mm do ápice radiográfico.
- presença de pino intraradicular;
- espaço entre o pino e o material obturador medido em mm;
- tamanho da lesão medida em mm com régua endodôntica;

4.1. Coleta das amostras

Foram realizadas as coletas microbiológicas da saliva, da coroa e do canal radicular durante o retratamento endodôntico, ou seja, na mesma sessão odontológica. O paciente, logo no início do atendimento, recebia um frasco plástico esterelizado para dispensar o fluido salivar acumulado naquele momento. Em seguida, iniciavam-se os procedimentos clínicos para as coletas da face interna das restaurações ou pino-intraradicular e da gutapercha removida dos canais durante a desobturação.

O método utilizado neste estudo já foi descrito previamente em detalhes por Gomes (1995) e Gomes *et al.* (1994; 1996a,b,c, 2006) e alguns princípios foram pré-estabelecidos para coletas microbiológicas, os quais foram adaptados para este estudo e estão descritos a seguir:

- Primeiro era realizada a coleta da saliva (S), a qual era dispensada em recipiente vazio e estéril. Recomendou-se aos pacientes um jejum de no mínimo 2 horas antes da consulta odontológica.
- Início dos procedimentos endodônticos - anestesia local.
- Desgaste da interface dente-restauração ou coroa total e quando presente do pino intra-radicular (formato recomendado para o uso do saca-pino MV, Trigona, Rio Claro, SP, Brasil) preservando a face interna da restauração ou pino.
- Isolamento absoluto.
- Descontaminação do grampo, lençol de borracha, arco e da face externa da coroa ou pino com água oxigenada 10v, NaOCl 2,5% e neutralização com tiosulfato de sódio 5% (Möller, 1966).
- A coleta da coroa (C) foi realizada durante a remoção do pino ou restauração, como também cárie, cimento endodôntico e material restaurador provisório, quando presentes na porção coronária. A amostra foi imediatamente armazenada em microtubos esterilizados contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993).
- Abertura coronária – forma de conveniência.

- A coleta do Endodonto (E) foi realizada durante a desobturação sem solventes, utilizando brocas de Gates-Glidden + limas tipo K (Maillefer/ Dentsply, Balaigues, Suíça). A guta-percha removida foi armazenada em microtubos esterilizados contendo 1,0 mL de VMGA III. Em casos de dentes bi ou trirradiculares a coleta era realizada no canal radicular mais amplo, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico.
- A utilização de localizador foraminal (Novapex, Forum Engineering Technologies, Rishon Lezion -Israel) foi complementar para a obtenção da patência (desobstrução apical) e em seguida, uma tomada radiográfica era realizada para verificar a remoção do material obturador. Após a desobstrução foraminal, foi coletado o exsudato dos dentes com drenagem via canal, ou então foi depositada solução salina no interior do canal radicular para a realização de uma coleta adicional. Para isto, foram utilizados cones de papel absorvente estéril (Maillefer/ Dentsply, Balaigues, Suíça) no comprimento do dente por 60 s, os quais foram armazenados no mesmo Eppendorf da coleta (E).

A coleta das amostras dos canais radiculares (Fig. 2a) e das coroas foram realizadas sob fluxo contínuo de nitrogênio (Berg & Nord, 1973).

Os Eppendorfs contendo as amostras microbiológicas foram imediatamente transportados para o laboratório de Microbiologia da Endodontia da FOP-UNICAMP.

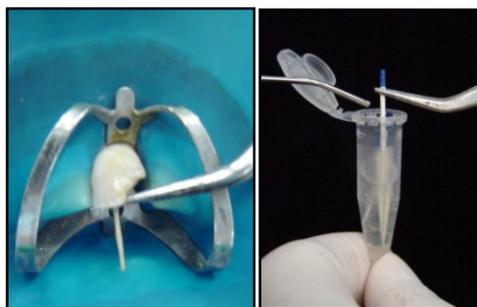


Figura 2. Coleta microbiológica com cone de papel absorvente (A-B)

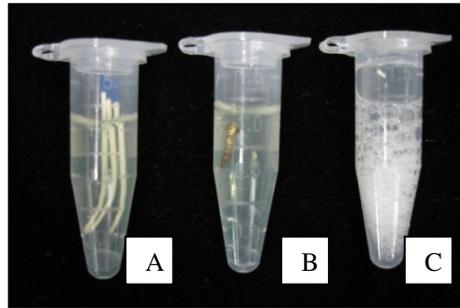


Figura 3. Eppendorfs contendo as coletas, A- Endodonto, B- Coroa, C- Saliva

Após as coletas das amostras microbiológicas, o dente em questão foi retratado e restaurado pelo mesmo operador. Foi feita a preservação de todos os retratamentos realizados neste experimento até o presente momento e serão acompanhados durante alguns anos.

4.2. Identificação de microrganismos pelo método da cultura

Os meios de cultura foram utilizados na forma de pó desidratado e suplementos seletivos pré-fabricados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante. O meio de transporte (VMGA III) foi preparado de acordo com a fórmula original (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993). (Anexo II)

Os Eppendorfs contendo as amostras da saliva, da coroa dental e do canal radicular (Fig. 3b) foram agitados por 60s dentro da câmara de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂. Alíquotas de 50 µL de cada uma destas amostras foram inoculadas em placas de petri contendo diversos meios de cultura e incubadas em diferentes condições gasosas, como descritos a seguir:

- Placas contendo BHI Agar* (Brain Heart Infusion Agar) + 5% de sangue de carneiro, incubadas em estufa de O₂ (aerobicamente), a 37°C, por 2 dias, para detecção de anaeróbios facultativos.
- Placas pré-reduzidas de FAA* - “Fastidious Anaerobe Agar” (Lab M, Bury, UK) contendo 5% de sangue de carneiro + 600 µL de Menadione (Vitamin K3; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone - SIGMA M5625) + 600 µL de Hemina (Hemin Bovine Minimum 80% – SIGMA H5533) que favorecem o crescimento das bactérias

produtoras de pigmento negro, a 37°C numa atmosfera anaeróbica com 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento. Foram realizadas duas diluições seriadas (1/10 e 1/100) apenas das amostras de canais radiculares utilizando “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK), sendo inoculados 50µl de cada diluição em placas de FAA pré-reduzidas.

Meios de cultura seletivos:

- Placas de Ágar m-Enterococcus – incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de *Enterococcus* spp.
- Placas de Ágar Mitis Salivarius* – incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias, seletivo para *S. mitis*, *S. salivarius* e *Enterococcus* spp.
- Placas de Ágar Sabouraud-dextrose acrescido de 0,1% de cloranfenicol – seletivo para detecção de espécies de leveduras, cujas placas foram incubadas por 4 dias à temperatura ambiente e depois incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias (Vianna *et al.*, 2005).
- Placas de Ágar MacConkey - incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de enterobactérias.

*Observações: Para inoculação nos meios BHI, FAA e Mitis Salivarius as amostras da saliva foram diluídas até 10⁻⁶ utilizando “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK), sendo inoculados 50 µL das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁶.

4.2.1. Morfologia colonial

Após a incubação, foi analisada a morfologia das colônias nas placas iniciais (Placa mãe) em esteremicroscópio (Lambda Let 2. Atto Instruments Co., Hong Kong - Fig. 4). A diferenciação das colônias foi feita de acordo com as suas características macroscópicas na placa, observando-se: tamanho, cor, forma, textura, elevação, borda, superfície, opacidade e efeito no agar (nenhum, hemólise parcial ou total).

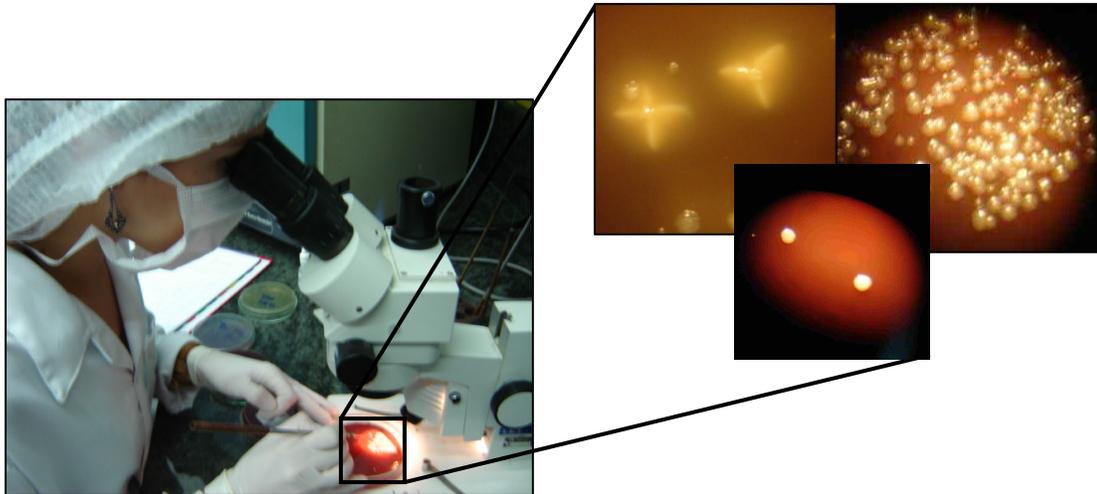


Figura 4. Análise do crescimento bacteriano através de lupa estereoscópica. As colônias foram diferenciadas de acordo com as suas características macroscópicas.

4.2.2. Requerimento gasoso microbiano

Cada colônia diferente foi subcultivada para a obtenção de culturas puras. A semeadura das placas subsequentes foi feita da seguinte forma: cada diferente colônia era transferida para uma placa de FAA pré-reduzida e para uma placa de BHI agar-sangue. As placas de FAA foram incubadas em câmara de anaerobiose para o crescimento de anaeróbios estritos e as placas de BHI foram incubadas em estufa de O_2 a $37^\circ C$, para o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos. Desta forma, as colônias bacterianas foram testadas quanto ao seu requerimento gasoso, ou seja, em qual condição gasosa houve um melhor crescimento bacteriano (Fig.5).



Figura 5. Requerimento gasoso utilizando a câmara de anaerobiose (A) e a estufa de CO_2 (B).

As anaeróbias estritas foram também incubadas em estufa de CO₂ (IG 150 CO₂ Incubator, Jouan S. A., Saint Herblain, Cedex, França), para a diferenciação entre anaeróbias estritas e capnofílicas.

4.2.3. Teste da coloração de *Gram*

Cada colônia foi subcultivada para a preparação das lâminas e observação ao microscópio óptico. Depois de fixar inóculo sobre a lâmina junto à chama, adicionou-se o corante cristal violeta. Um minuto depois lavou-se com água para retirar o excesso de corante. Colocou-se lugol, um minuto depois retirou-se o reagente com álcool etílico e de seguida lavou-se com água. Colocou-se safranina, e após um minuto retirou-se o excesso do reagente com água (Newprov – Produtos para Laboratório, Pinhais – PR, Brasil). Por fim, observou-se ao microscópio *Zeiss*. Com a coloração obtida determinou-se se o microorganismo era *Gram* negativo (coloração rosa) ou *Gram* positivo (coloração violeta).

4.2.4. Teste da Catalase

Com uma pipeta de *Pasteur*, colocou-se uma gota de peróxido de oxigénio (H₂O₂) 30v, numa placa de Petri na qual se espalhou uma colônia bacteriana. A imediata liberação de pequenas bolhas de gás indicou a presença da enzima catalase.

A enzima catalase cataliza a degradação do peróxido de hidrogénio a água e oxigénio molecular ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$). Os organismos catalase-positivos rapidamente produzem bolhas quando expostos a uma solução contendo peróxido de hidrogénio. O teste da catalase é fundamental para a diferenciação entre muitos microrganismos gram-positivos. Por exemplo, os estafilococos são catalase-positivos, enquanto os enterococos são catalase-negativos.

4.2.5. Teste da Oxidase

O teste da oxidase foi realizado nas bactérias Gram-negativas e catalase-positivas, auxiliando na identificação de enterobactérias, que respondem negativamente ao teste da oxidase. Desta forma, foram colocadas algumas gotas de uma solução a 1% de tetrametil-p-

fenilenediamina num papel de filtro. Inicialmente foi feito um controlo negativo, isto é, com uma alça esterilizada tocou-se no papel de filtro molhado e verificou-se uma reação negativa, ou seja, ausência de desenvolvimento de cor. De seguida com a alça esterilizada impregnou-se uma porção da cultura no papel molhado. O resultado positivo do teste consistia no desenvolvimento de uma coloração violeta num período de 10-15 segundos, indicativo da presença da enzima citocromo e oxidase.

4.2.6. Identificação das espécies através de Kits comerciais (BioMérieux)

Os seguintes Kits comerciais (ANEXO IX) foram utilizados para a identificação das espécies dos microrganismos isolados:

- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os bastonetes Gram-negativos e Gram-positivos, cocos Gram-positivos e anaeróbios obrigatórios.
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estafilococos e micrococcos (cocos Gram-positivos, catalase-positiva)
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase-negativa)
- API 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para as enterobactérias (Bacilos entéricos Gram-negativos, catalase-positiva, oxidase-negativa).
- API NH (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus* (cocos e bacilos Gram-negativos e facultativos, oxidase-positiva)
- API AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para identificar espécies de *Candida*

Cada Kit possui diferentes galerias Biomérieux (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) contendo uma sequência de microtubos com vários testes na forma de meios e substratos desidratados. Desta forma, as galerias para os testes convencionais foram inoculadas com uma suspensão bacteriana salina que reconstituiu os meios. As bactérias que conseguiram utilizar o substrato correspondente, foram capazes de crescer. Durante a

incubação, o metabolismo bacteriano foi visível através da turvação ou mudança de cor espontânea ou revelada pela adição de reagentes. As reações foram lidas de acordo com uma tabela, existente no manual do teste. No presente trabalho, a identificação foi realizada através do Catálogo Analítico e através do site “<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/watertesting/api/apiweb.htm>”

4.3. Teste de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente

Foi realizado o teste de suscetibilidade/resistência através do método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia) em apenas 1 colônia de *Enterococcus faecalis* isolada de cada canal radicular quando detectada. Dos 42 casos estudados, 14 canais apresentaram *E. faecalis*, portanto 14 colônias foram testadas.

Os agentes antimicrobianos testados foram:

- Benzilpenicilina (PG)
- Amoxicilina (AC)
- Amoxicilina + ácido clavulânico (XL)
- Eritromicina (EM)
- Azitromicina (AZ)
- Vancomicina (VA)
- Cloranfenicol (CL)
- Tetraciclina (TC)
- Ciprofloxacina (CI)
- Rifampicina (RI)
- Moxifloxacina (MX)
- Doxicilina (DC)

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 CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993) (Fig. 5).

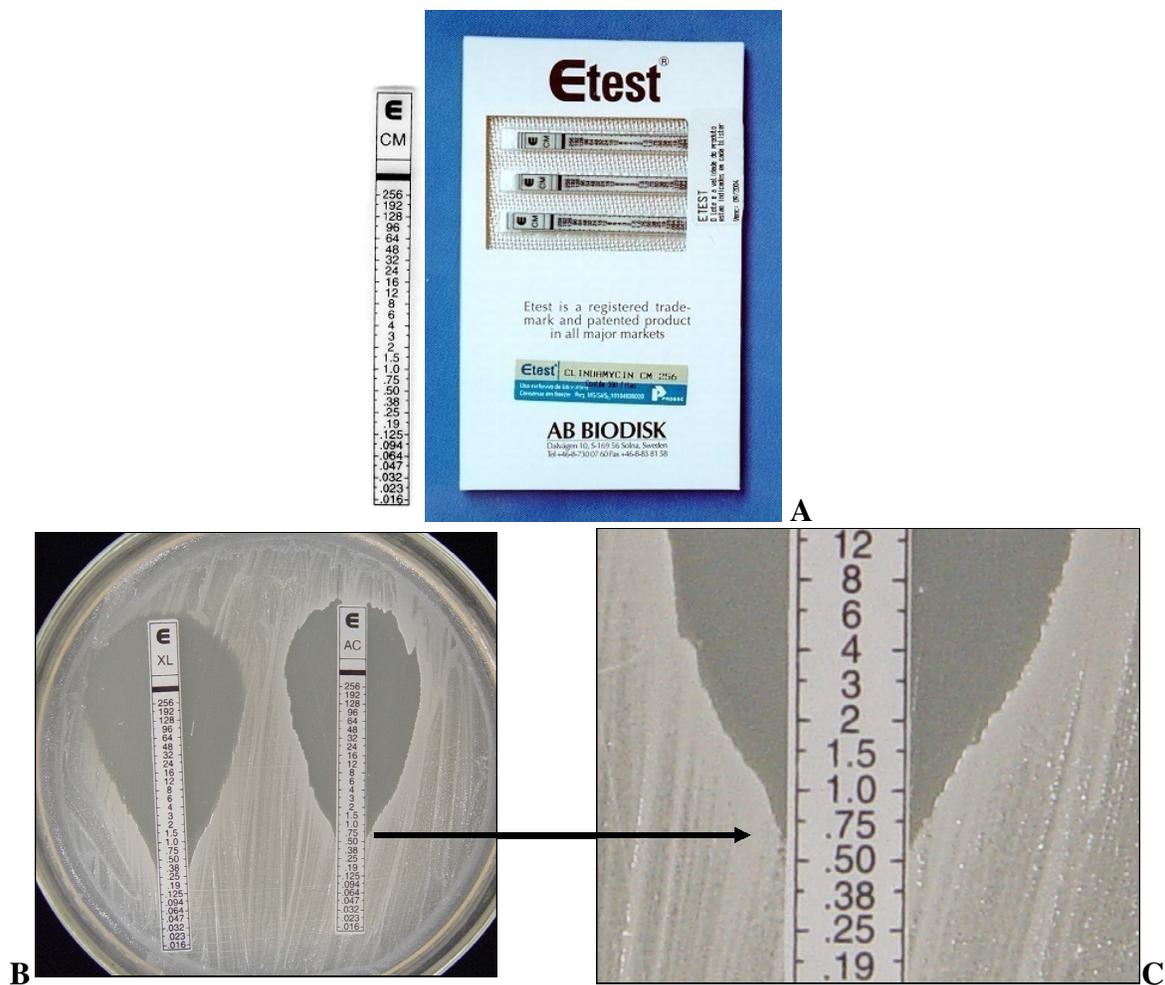


Figura 5. E-test: A-apresentação, B- Halos de inibição dos antibióticos XL (amoxicilina) e AC (amoxicilina e ácido clavulânico), C- Valor da CIM (concentração inibitória mínima).

Para preparar o inóculo, após 24-48 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue, as colônias bacterianas foram transferidas para o meio líquido “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB) e agitadas para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo - SP, Brasil), que foi verificado no espectrofotômetro (MARCONI, Piracicaba - SP, Brasil).

Placas contendo 4 mm de espessura Mueller-Hinton ágar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de swab estéril, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test, que haviam sido previamente removidas do congelador e já se encontravam a temperatura ambiente

cerca de 20 minutos, foram distribuídas nas placas com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada. O experimento foi executado em duplicata e sempre em fluxo laminar.

As placas foram incubadas em condições aeróbicas e a leitura realizada após 16-20 horas. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento.

De acordo com as recomendações do fabricante, foi utilizado o guia de interpretação da *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS-M100 S15 (Tabela 1) para se determinar o perfil de suscetibilidade e resistência de espécies de *Enterococcus* spp.

Tabela 1 – 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

4.4. Confirmação dos *Enterococcus faecalis* isolados da saliva, da coroa e do canal radicular através de técnicas moleculares (n=74)

Um total de 107 colônias de *E. faecalis*, previamente isoladas pelo método da cultura utilizando meio seletivo m-Enterococcus e identificadas por kits comerciais (Api 20 Strep, BioMerieux SA, Marcy-l'Etoile, Franca) foram também identificadas através de métodos moleculares utilizando *primers* de *E. faecalis* e de *E. faecium*. O objetivo foi excluir as cepas positivas para de *E. faecium*.

4.4.1. Extração do DNA, reação de PCR utilizando *primers* de identificação e gel eletroforese

De cada colônia previamente isolada, foi realizada cultura por 24h e em seguida o DNA foi extraído utilizando o Qiamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante, descritas a seguir:

1. Foram adicionados 500 µl de solução AE (Elution Buffer) em cada microtubo contendo as amostras de *E. faecalis*.
2. Centrifugou-se a 8000 rpm por 5 minutos,
3. Removeu-se o sobrenadante,
4. Adicionou-se 180µl de ATL (Tissue Lysis Buffer) e 20µL de proteinase K,
5. Incubou-se a 56°C por 30 minutos,
6. Adicionou-se 200µL de AL (Lysis Buffer) e novamente foram incubadas a 70°C por 10 minutos,
7. Foram adicionados 200µL de etanol 100% e transferiu-se todo volume para tubos com filtro (QL Amp Mini Spin Collum),
8. Centrifugou-se os tubos a 8000 rpm por 1 minuto,
9. O filtro foi transferido para outro tubo vazio do kit,
10. Adicionou-se 500µl de AW1 (Wash Buffer 1)
11. Novamente centrifugou-se a 8000 rpm por 1 minuto,
12. O mesmo processo foi realizado para a adição de 500µl de AW2 (Wash Buffet 2),
13. Centrifugou-se a 13000 rpm por 3 minutos.
14. Os filtros foram transferidos para eppendorfs de 1,5 mL com tampa,
15. Adicionou-se 100µL de solução AE (Elution Buffer),
16. Aguardou-se 3 minutos para nova centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto
17. A solução obtida continha o DNA das amostras e foi conservada em freezer - 20°C para posterior processamento.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Alíquotas de 1,5 µL do DNA extraído (aproximadamente 75 ng) das amostras com as cepas já isoladas foram amplificadas utilizando *primers* específicos para *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Tabela 2). As reações de PCR utilizadas nesse estudo foram adaptadas de Sedgley *et al.* (2005). Essas reações foram 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 platinum taq* (5 U/µL, *Invitrogen*))
- 18,6 µL de água Mili-Q

Tabela 2. Pares de *primers* utilizados nas reações de PCR para detecção de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados da saliva, da coroa e do canal radicular.

<i>Espécies</i>	<i>Pares de primers (5'-3')</i>	<i>Comprimento do fragmento amplificado em pb</i>	<i>Referência</i>
<i>E. faecalis</i> <i>16S rRNA</i>	CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	138	Sedgley <i>et al.</i> 2005
<i>E. faecalis</i>	ATC AAG TAC AGT TAG TCT T ACG ATT CAA AGC TAA CTG	941	Dutka-malen <i>et al.</i> 1995
<i>E. faecium</i>	TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC	658	Cheng <i>et al.</i> 1997

Foi utilizado um aparelho de termociclagem *Biocycler* (Biometra, Gottingen, Alemanha) para a amplificação do DNA, seguindo os protocolos de temperatura descritos acima, seguindo o artigo de Sedgley *et al.* (2005).

Programa para o *primer* EF16S rRNA

- 95 °C por 15 minutos (temperatura inicial de desnaturação)
- 35 ciclos:
 - 94 °C por 20s,
 - **68 °C por 45s** (anelamento)
 - 72 °C por 15s
- 72 °C por 10 minutos (extensão final)

Programa para o *primer* *E. faecalis*

- 95 °C por 2 minutos (temperatura inicial de desnaturação)
- 36 ciclos:
 - 94 °C por 30s,
 - **45 °C por 1 minuto** (anelamento)
 - 72 °C por 2 minutos
- 72°C por 10 minutos (extensão final)

Programa para o *primer* *E. faecium*

- 95 °C por 2 minutos (temperatura inicial de desnaturação)
- 36 ciclos:
 - 94 °C por 30s,
 - **55 °C por 1 minuto** (anelamento)
 - 72 °C por 2 minutos
- 72 °C por 10 minutos (extensão final)

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio adicionados diretamente no gel, e visualizados sob luz ultravioleta (UV). As reações foram consideradas positivas na presença de bandas de tamanho molecular apropriado.

4.5. Investigação dos fatores de virulência dos *Enterococcus faecalis* através de métodos de cultura e técnicas moleculares

Após a seleção por PCR, apenas as amostras positivas para a espécie de *E. faecalis* foram utilizadas para o estudo dos determinantes virulentos. Desta maneira, foram estudados 10 casos clínicos, num total de 74 cepas de *E. faecalis* isoladas da saliva, da coroa e dos canais radiculares (Tabela 3).

Tabela 3. Casos clínicos e número de colônias de *E. faecalis* (n=74) isoladas.

10 Casos clínicos	Endodonto	Coroa	Saliva
# 8	3	1	-
# 21	9	-	-
# 28	2	-	-
# 31	10	8	8
# 34	8	-	-
# 35	2	1	-
# 36	-	-	1
# 37	2	4	1
# 40	8	3	-
# 41	3	-	-
Total	47	17	10

4.5.1. Extração do DNA, reação de PCR utilizando *primers* de determinantes virulentos e gel eletroforese

Quinhentos microlitros de cada amostra de *E. faecalis* (n=74) da coroa, saliva e canal radicular foram utilizados para extração de DNA como descrito acima, o Qiap DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 4. Pares de primers utilizados nas reações de PCR para detecção de determinantes virulentos em cepas de *E. faecalis* previamente isoladas.*

<i>Genes</i>	<i>Pares de primers (5'-3')</i>	<i>Comprimento do fragmento amplificado em pb (pares de base)</i>
<i>ace</i>	GGA ATG ACC GAGAAC GAT GGC GCT TGA TGT TGG CCT GCT TCC G	616
<i>efaA</i>	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	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	932
<i>gelE</i>	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	405

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

Foram utilizadas alíquotas de 1,5 µL do DNA extraído (aproximadamente 75 ng) de cada amostra clínica. Essas reações foram 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 platinum taq* (5 U/µl, *Invitrogen*),
- 18,6 µl água Mili-Q.

Os primers específicos e a provável amplificação para dos genes relacionado aos fatores de virulência (número de bases pares – bp) estão citados na Tabela 4. 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*).

Foi 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
- 72 °C por 2 minutos (extensão final)

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

4.5.2. Atividade da Citolisina e Gelatinase

4.5.2.1. A citolisina confere ao *E. faecalis* a citotoxicidade e a atividade hemolítica conforme o trabalho de Sedgley *et al.* (2005). A presença da citolisina ativa foi estudada fenotipicamente através de placas de Agar Brucella contendo: 4.3% de Agar Brucella, 0.5% de hemina, 1% de menadiona e 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

As cepas foram inoculadas e incubadas á 37 °C *overnight*

A detecção da produção da enzima: citolisina foi interpretada como positiva se houvesse a hemólise completa (b-hemolítica), ou seja, presença de translucência ao redor da colônia bacteriana.

4.5.2.2. A atividade enzimática da gelatinase foi determinada através da inoculação em placas de agar gelatina contendo: 3% de gelatina, 1% de extrato de levedura, 1 % de peptona e 1 % de agar (Sedgley *et al.* 2005).

A reação foi considerada positiva quando observado um halo translúcido ao redor das colônias com 24-48 h de incubação á 37°C.

4.6. Diferenciação das cepas de *Enterococcus faecalis* utilizando métodos de tipagem

4.6.1. Protocolo para extração de DNA (Universidade de Iowa – USA)

Preparo das amostras de *E. faecalis* para a extração de DNA

1. Inoculou-se por 24 horas em estufa à 37°C, 100 µL de *E. faecalis* da amostra congelada em 25 mL de BHI caldo. Utilizou-se 2 tubos para cada amostra.
2. A cultura foi centrifugada à 8000 rpm por 10 minutos em centrífuga grande, em seguida foi descartado sobrenadante. As células foram resuspensas em 2 mL de TE Buffer e agitadas em Vortex. Essa mistura foi dividida em 2 tubos cada, sendo então obtidos 4 tubos com 1 mL de cada amostra.
3. Foram reservadas em freezer à - 20 °C até o momento da extração do DNA.

Extração do DNA utilizando protocolo do Master Mix Kit modificado

1. As células já resuspensas em TE Buffer foram descongeladas e agitadas em Vortex por 60s. Em seguida, foi transferido 1 mL para um tubo de Eppendorf e adicionados 2 µL de 5X Ready Lyse (1,250U/ µL).
2. As amostras foram agitadas manualmente e incubadas a 37 °C por 1 hora, sendo que a cada 15 minutos os tubos eram novamente agitados manualmente.
3. Foi diluído 1 µL de Proteinase K (50 µg/ µL) em 150 µL de 2X T+C Lysis Solution para cada amostra (exemplo: 8 µL PK/1200 µL de 2X T+C para 8 amostras). Em seguida, foram adicionados 150 µL desta solução (2X T+C + Proteinase K) a cada amostra.

4. Os tubos foram agitados manualmente e incubados a 67 °C por 25 minutos, sendo agitados em Vortex a cada 5 minutos.
5. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 10 minutos.
6. Foram adicionados 4 µL de RNAase A (5 µg/µL) a cada amostra e as mesmas foram agitadas manualmente e incubadas a 37 °C por 1 hora.
7. Antes da precipitação do DNA, as amostras foram deixadas no gelo por 5 minutos.

Precipitação do DNA

Nesta segunda etapa, as amostras ficaram sempre sobre o gelo, seguindo o protocolo abaixo:

1. Foram adicionados 150 µL de MPC (Protein Precipitation Reagent) em 300 µL de cada amostra (divididas em 3 Eppendorfs) e agitadas em vortex por 10 segundos.
2. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.
3. O sobrenadante foi transferido pra um novo Eppendorf, sendo o *pellet* descartado.
4. Foram adicionados 500 µL de isopropanol e os tubos foram invertidos 30 vezes para misturar esta solução.
5. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 10.000 rpm.
6. O isopropanol foi removido cuidadosamente, assim o *pellet* de DNA foi mantido.
7. Foi utilizado etanol a 75% para lavar o *pellet*, por 2 vezes consecutivas, de forma cuidadosa para que o *pellet* de DNA não fosse perdido ou desfeito. Em seguida, o etanol residual foi removido e a amostra foi desidratada por 10 minutos dentro a cabine de DNA.
8. Para finalizar, foram utilizados 40 µL de TE Buffer para ressuspender o *pellet* de DNA. As amostras com DNA extraído foram armazenadas em geladeira.

A concentração de DNA das amostras foi medida através de espectrofotômetro. (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE - USA) e reservadas em geladeira (- 4 °C).

4.6.2. Protocolos das reações de REP-PCR utilizando *primers* ERIC1R, ERIC2 e de AP-PCR utilizando o *primer* RW3A

As diluições do DNA de cada amostra foram realizadas no momento da reação, através da equação $C_1V_1=V_2C_2$, utilizando-se água esterelizada e deionizada, para atingir a concentração de acordo com o protocolo utilizado em cada reação de PCR.

Tabela 5. *Primers* utilizados nas reações de REP-PCR e AP-PCR.

<i>Primers</i>	<i>Pares de primers</i>	<i>Referência</i>
ERIC1R	3' - CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA - 5'	Versalovic <i>et al.</i> 1991
ERIC2	5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGEGCG - 3'	
RW3A	5' - TCGCTCAAACAACGACACC - 3'	DelVecchio <i>et al.</i> 1995

Protocolo da reação de REP-PCR (*primer* ERIC1R, ERIC2)

As reações de REP-PCR utilizadas nesse estudo foram adaptadas de Versalovic *et al.* (1991). Essas reações foram realizadas em um volume total de 50 μ L, contendo:

- 31,65 μ L H₂O DNAase free
- 8 μ L de MgCl₂ (2 mM)
- 5,0 μ L de 10X PCR Gold buffer (sem MgCl₂)
- 1,0 μ L de dNTP mix (10mM)
- 1,25 μ L de AmpliTaq Gold Polymerase
- 1 μ L de *primer* ERIC1R (100 ng)
- 1 μ L de *primer* ERIC2 (100 ng)
- 2 μ L DNA (100 ng), concentração final do DNA = 200 ng

*Produtos Amplitaq Gold foram adquiridos pela Applied Biosystems, Foster City, CA.

Foi utilizado um aparelho de termociclagem *Biocycler* (Biometra, Gottingen, Alemanha) para a amplificação do DNA, seguindo o protocolo de temperatura descrito por Versalovic *et al.* (1991), a seguir:

- 95 °C por 7 minutos (temperatura inicial de desnaturação)
- 30 ciclos:
 - 90 °C por 30s,
 - 52 °C por 1 minuto
 - 65 °C por 8 minutos
- 65 °C por 16 minutos (extensão final)

Protocolo da reação de AP-PCR (*primer RW3A*)

Cada reação foi realizada em um volume total de 50 µL, seguindo o protocolo citado por DelVecchio *et al.* (1995):

- 31,65 µL H₂O DNAase free
- 8 µL de MgCl₂ (25 mM)
- 5,0 µL de 10X PCR Gold buffer (sem MgCl₂)
- 1,0 µL de dNTP mix (10mM)
- 0,35 µL de AmpliTaq Gold Polymerase
- 2 µL de *primer* (100 picomoles/ µL, concentração final de 200 picomoles)
- DNA 2 µL (100 ng), concetração final do DNA = 200 ng

*Produtos Amplitaq Gold foram adquiridos pela Applied Biosystems, Foster City, CA.

Foi utilizado um aparelho de termociclagem *Biocycler* (Biometra, Gottingen, Alemanha) para a amplificação do DNA, seguindo o protocolo de temperatura descrito por DelVecchio *et al.* (1995) com algumas modificações, a seguir:

- 95 °C por 5 minutos (temperatura inicial de desnaturação)
- 40 ciclos:
 - 94 °C por 1 minuto,
 - 54 °C por 1 minuto
 - 72 °C por 2 minutos
- 72 °C por 5 minutos (extensão final)

Eletroforese

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose-Tris-borato-EDTA (Type 1-A; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), corados com Brometo de Etídeo e visualizados e fotografados sob luz UV. As reações foram analisadas visualmente através de inúmeras bandas de tamanho molecular diferentes. (Apêndice IV)

Análise visual das imagens

Foram escolhidas as amostras que serviram de referência para cada diferente genótipo, como uma escala, em seguida, as amostras foram divididas em grupos representando os diferentes genótipos observados (Figura 10).

Para o método utilizando o *primer* ERIC, foi necessária uma variação de 3 ou mais bandas para a classificação das amostras, já para o método do *primer* RW3A, 1-2 bandas diferentes já foi suficiente para considerá-lo um outro grupo de genótipo.

4.7. Análise estatística

Os dados coletados na identificação dos microorganismos através do método de cultura foram introduzidos numa planilha de cálculo Excel e estatisticamente analisados usando SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O teste de “Pearson chi-square”, ou “Fisher’s Exact Test” quando apropriado, foram utilizados para testar a hipótese nula de que não existe relação entre os aspectos clínicos e radiográficos dos dentes com tratamento endodôntico prévio e a presença de microorganismos específicos.

5. RESULTADOS

No total, foram coletadas 126 amostras sendo da saliva (n=42), da coroa dental (n=42) e dos canais radiculares (n=42). As amostras foram investigadas também quanto as suas características clínicas e radiográficas e se encontram organizadas na Tabela 5.

O número e porcentagem dos gêneros microbianos mais frequentemente isolados dos canais radiculares foram: *Staphylococcus* (18 – 42,9%), *Streptococcus* (14 - 33,3%), *Enterococcus* (14 - 33,3%), *Actinomyces* (13 - 31%), *Gemella* (9 - 21,4%), *Micrococcus* (6 - 14,3%), *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* (4 – 9,5%), *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* (3 – 7,1%), *Lactobacillus*, (2 – 4,8%) e *Candida* (1 - 2,4%), que estão descritos na Tabela 9.

Nos testes de suscetibilidade dos casos clínicos número 10, 28 e 37, cada cepa foi resistente a pelo menos 6 antibióticos, a cepa do caso 28, por exemplo, foi resistente a Vancomicina e a Amoxicilina, apresentando um perfil multi-resistente.

Os teste da citolisina e gelatinase apresentaram os mesmo resultados independente do método utilizado, ou seja, cultura ou PCR, sendo que a citolisina não foi detectada em nenhuma das amostras e a gelatinase foi detectada em todas as amostras testadas (Tabela 15).

Nos resultados dos métodos de tipagem, Rep-PCR e AP-PCR, cada *primer* testado mostrou 7 diferentes genótipos (G), os quais foram observados visualmente pelas bandas marcadas no gel de eletroforese (Figuras 11 e 13, Tabelas 14 e 16).

Do total de casos testados com o método PCR, apenas 2 casos clínicos possuíam amostras coletadas dos 3 diferentes sítios. Assim, independente da técnica de diferenciação utilizada, o caso clínico número 37 apresentou similaridade entre as cepas de *E. faecalis* dos 3 sítios estudados. Por outro lado, no caso número 31, o mesmo genótipo foi observado apenas na coroa e no canal radicular sendo diferente da amostra da saliva (Tabelas 13 e 15).

Foi observado que os genótipos das cepas de *E. faecalis* isoladas de um mesmo sítio apresentaram similaridade entre si, independente do método utilizado. Além disso, a análise comparativa dos métodos REP e AP-PCR mostrou que os genótipos encontrados em ambos os métodos foram igualmente classificados (Tabela 17).

Tabela 5 - Características clínicas e radiográficas relacionadas às espécies microbianas identificadas na saliva, na coroa e no canal radicular de 42 dentes com insucesso endodôntico.

N	I	S	Dente	QUA REST	QUA OBT	NUM ESP	Espaço Pino/Obt	Limite apical	Diam Lesão	Fis	E	Dor Prev	Dor perc	TEP	Microrganismos na Saliva	Microrganismos na Coroa	Microrganismos no Canal Radicular
1	38	M	11 uni	R	R	6	-	1 mm	6 mm	S	P	S	S	10	<i>C. albicans</i> , <i>S. lentus</i>	<i>E. limosum</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. limosum</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>P. acnes</i> , <i>P. buccae</i>
2	38	M	15 uni	B	R	3	1 mm	2 mm	2 mm	N	A	N	S	10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>S. lentus</i>	<i>Micrococcus</i> spp., <i>A. viscosus</i> , <i>S. lentus</i>
3	33	F	22 uni	B	B	5	0 mm	1 mm	+20mm	N	A	N	N	10	<i>E. faecalis</i>	<i>Veillonella</i> spp., <i>S. saliv salivarius</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>S. mitis</i> 1, <i>A. viscosus</i>	<i>A. israelii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>C. bifermentans</i>
4	28	M	34 bi	B	B	1	-	1 mm	3 mm	N	A	N	N	+5	-	<i>H. influenzae</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>E. limosum</i> , <i>S. lentus</i>	<i>S. marcescens</i>
5	47	M	44 uni	B	B	4	-	0 mm	3 mm	N	A	N	N	+5	<i>S. xyloso</i>	<i>S. constellatus</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. xyloso</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. limosum</i> , <i>M. lentus</i> , <i>S. xyloso</i>
6	38	F	22 uni	R	B	2	-	1 mm	4 mm	N	A	N	N	+5	<i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i>	<i>S. mutans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>A. israelii</i>	<i>A. israelii</i> , <i>S. mutans</i>
7	42	M	22 uni	B	R	2	2 mm	2 mm	2 mm	N	A	N	S	+5	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>S. mitis</i> 1, <i>S. lentus</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>S. mutans</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i>
8	64	F	45 uni	B	R	1	1 mm	1 mm	2 mm	N	A	N	N	10	<i>S. lentus</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
9	17	F	12 uni	R	R	5	-	0 mm	5 mm	N	A	N	N	+5	<i>C. albicans</i>	<i>P. buccae</i> , <i>A. meyeri</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>S. acidominimus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>S. salivarius</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>A. meyeri</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>P. buccae</i> , <i>C. acetobutylicum</i>
10	31	M	22 uni	B	R	4	2 mm	1 mm	5 mm	N	A	N	N	+5	<i>C. albicans</i> , <i>S. lentus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>S. marcescens</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. mitis</i> 1

N = número do caso clínico. **I** = idade. **S** = sexo (M-masculino, F-feminino). **Dente** = número do dente e anatomia (unirradicular, birradicular, trirradicular). **QUA REST** = qualidade da restauração (B-Boa, R-Ruim). **QUA OBT** = qualidade da obturação: (B-boa, R-ruim). **NUM ESP** = número de espécies de microrganismos por canal. **ESP PINO/OBT** = espaço vazio entre o pino e a obturação. **Limite Apical** = espaço entre a obturação e o forame apical (em mm). **Diam Lesão** = diâmetro da lesão (em mm). **FIS** = fistula (P-Presente, A-Ausente). **E** = Exudato pós-desobturação (A-ausente, H-hemorrágico, P-purulento). **DDR PREV** = se o paciente teve alguma dor neste dente (A-ausente, P-presente). **DDR PERC** = dor à percussão (A-ausente, P-presente). **TEP** = terapia endodôntica prévia (em anos). Microrganismos identificados na saliva na coroa e no canal radicular.

Tabela 5 - Características clínicas e radiográficas relacionadas às espécies microbianas identificadas na saliva, na coroa e no canal radicular de 42 dentes com insucesso endodôntico (Cont.).

N	I	S	Dente	QUA REST	QUA OBT	NUM ESP	Espaço Pino/Obt	Limite apical	Diam Lesão	Fis	E	Dor Prev	Dor perc	TEP	Microrganismos na Saliva	Microrganismos na Coroa	Microrganismos no Canal Radicular
11	50	M	12 uni	B	B	5	1 mm	2 mm	5 mm	N	A	N	N	10	<i>E. faecalis</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>C. albicans</i>	<i>S. odorifera</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. marcescens</i>	<i>S. odorifera</i> , <i>xylosum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>E. aerogenes</i>
12	17	F	11 uni	R	R	4	-	1 mm	10 mm	N	A	N	N	+5	<i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>C. albicans</i>	<i>A. viscosus</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>E. limosum</i>	<i>A. meyeri</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>P. micros</i>
13	65	M	35 uni	B	R	8	-	3 mm	3 mm	S	A	N	N	10	<i>C. albicans</i>	<i>S. lentus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>S. mitis</i> 1	<i>S. lentus</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. mitis</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>E. limosum</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>B. adolescentis</i> 2, <i>A. odontolyticus</i>
14	52	F	15 uni	R	R	4	2 mm	4 mm	+20 mm	N	P	N	N	+20	<i>C. albicans</i> , <i>E. aerogenes</i>	<i>P. intermédia</i> , <i>S. mitis</i> 1, <i>C. acetobutylicum</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>G. morbillorum</i> ,	<i>G. morbillorum</i> , <i>P. prevotti</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>C. bifementans</i>
15	52	F	14 uni	B	R	2	2 mm	5 mm	+20 mm	N	H	N	N	+20	<i>C. albicans</i> , <i>E. aerogenes</i>	<i>C. albicans</i> , <i>S. mitis</i> 1, <i>A. odontolyticus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>C. acetobutylicum</i>	<i>S. xylosum</i> , <i>P. acnes</i>
16	43	F	34 uni	B	B	4	-	0 mm	5 mm	N	A	N	N	10	<i>S. lentus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
17	30	M	22 uni	R	B	1	-	0 mm	+10 mm	S	A	N	N	4	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i> 1	<i>S. mitis</i> 1
18	15	F	46 tri	B	B	5	-	0 mm	3 mm	N	A	N	N	5	<i>E. cloacae</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. lentus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>P. pseudomonas</i> spp.
19	59	M	43 uni	R	R	2	-	5 mm	3 mm	N	A	N	S	10	<i>S. sciuri</i> , <i>S. lentus</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. morbillorum</i> , <i>A. viscosus</i>
20	43	F	22 uni	B	R	3	1 mm	3 mm	3 mm	N	A	N	S	10	<i>S. lentus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. mitis</i> 1	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. mutans</i> , <i>L. lactis cremoris</i>

N = número do caso clínico. **I** = idade. **S** = sexo (M-masculino, F-feminino). **Dente** = número do dente e anatomia (unirradicular, birradicular, trirradicular). **QUA REST** = qualidade da restauração (B-Boa, R-Ruim). **QUA OBT** = qualidade da obturação: (B-boa, R-ruim). **NUM ESP** = número de espécies de microrganismos por canal. **ESP PINO/OBT** = espaço vazio entre o pino e a obturação. **Limite Apical** = espaço entre a obturação e o forame apical (em mm). **Diam Lesão** = diâmetro da lesão (em mm). **FIS** = fistula (P-Presente, A-Ausente). **E** = Exudato pós-desobturação (A-ausente, H-hemorrágico, P-purulento). **DOR PREV** = se o paciente teve alguma dor neste dente (A-ausente, P-presente). **DOR PERC** = dor à percussão (A-ausente, P-presente). **TEP** = terapia endodôntica prévia (em anos). Microrganismos identificados na saliva na coroa e no canal radicular.

Tabela 5. Características clínicas e radiográficas relacionadas às espécies microbianas identificadas na saliva, na coroa e no canal radicular de 42 dentes com insucesso endodôntico (Cont.).

N	I	S	Dente	QUA REST	QUA OBT	NUM ESP	Espaço Pino/OBT	Limite apical	Diam Lesão	Fis	E	Dor Prev	Dor perc	TEP	Microrganismos na Saliva	Microrganismos na Coroa	Microrganismos no Canal Radicular
21	61	F	23 uni	R	R	9	1 mm	1 mm	4 mm	N	A	N	S	10	-	<i>L. lactis cremoris</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>S. acidominimus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>A. israelii</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp.,	<i>L. lactis cremoris</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. israelii</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>A. salmonicida</i>
22	31	F	15 uni	R	R	6	2 mm	0 mm	4 mm	N	A	S	S	2	<i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. xylosum</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. acnes</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>C. tetani</i>
23	43	F	46 tri	R	B	2	-	0 mm	+20 mm	S	A	S	S	6	<i>C. albicans</i>	<i>S. acidominimus</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. acidominimus</i>
24	59	M	31 uni	R	R	1	-	3 mm	+40 mm	N	A	N	S	+30	<i>P. mirabilis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
25	59	M	41 uni	R	B	1	-	2 mm	+40 mm	N	P	N	S	+30	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
26	59	M	42 uni	R	R	2	-	2 mm	+40 mm	N	P	N	S	+30	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. acidominimus</i> , <i>S. aureus</i>
27	30	M	11 uni	R	R	2	-	3 mm	+10 mm	S	A	N	N	5	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. anginosus</i>	<i>A. naeslundii</i> , <i>S. aureus</i>
28	61	F	13 uni	B	R	6	0 mm	5 mm	4 mm	N	A	S	N	10	-	<i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. aphrophilus</i>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
29	43	F	21 uni	R	R	7	-	3 mm	3 mm	S	A	N	S	10	<i>E. faecium</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>A. meyeri</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saliv salivarius</i>
30	43	F	11 uni	B	B	7	-	0 mm	3 mm	N	A	N	N	10	<i>E. faecium</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1	<i>S. mitis</i> 1, <i>P. micros</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. israelii</i>
31	59	F	25 uni	R	R	5	3	3 mm	3 mm	N	A	N	N	18	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>Micrococcus</i> spp.	<i>E. faecalis</i> , <i>S. Salivarius</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>P. intermedia</i> , <i>G. morbillorum</i>
32	37	F	35 uni	B	R	1	-	3 mm	5 mm	N	A	N	N	6	<i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>Neisseria</i> spp.	<i>Micrococcus</i> spp.
33	42	F	11 uni	B	B	1	0	1 mm	4 mm	N	A	S	N	18	<i>S. warneri</i>	-	<i>Micrococcus</i> spp.

N = número do caso clínico. **I** = idade. **S** = sexo (M-masculino, F-feminino). **Dente** = número do dente e anatomia (unirradicular, birradicular, trirradicular). **QUA REST** = qualidade da restauração (B-Boa, R-Ruim). **QUA OBT** = qualidade da obturação: (B-boa, R-ruim). **NUM ESP** = número de espécies de microrganismos por canal, **ESP PINO/OBT** = espaço vazio entre o pino e a obturação. **Limite Apical** = espaço entre a obturação e o forame apical (em mm). **Diam Lesão** = diâmetro da lesão (em mm). **FIS** = fistula (P-Presente, A-Ausente). **E** = Exudato pós-desobturação (A-ausente, H-hemorrágico, P-purulento). **DOR PREV** = se o paciente teve alguma dor neste dente (A-ausente, P-presente). **DOR PERC** = dor à percussão (A-ausente, P-presente). **TEP** = terapia endodôntica prévia (em anos). Microrganismos identificados na saliva na coroa e no canal radicular.

Tabela 5. Características clínicas e radiográficas relacionadas às espécies microbianas identificadas na saliva, na coroa e no canal radicular de 42 dentes com insucesso endodôntico (Cont.).

N	I	S	Dente	QUA REST	QUA OBT	NUM ESP	Espaço Pino/Obt	Limite apical	Diam Lesão	Fis	E	Dor Prev	Dor perc	TEP	Microorganismos na Saliva	Microorganismos na Coroa	Microorganismos no Canal Radicular
34	41	F	11 uni	R	R	1	2	4 mm	2 mm	N	A	N	N	6	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
35	59	F	23 uni	R	B	1	1	3 mm	3 mm	N	A	N	N	18	<i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
36	43	F	12 uni	R	R	6	-	4 mm	4 mm	N	A	N	N	10	<i>E. faecium</i> , <i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>A. viscosus</i> , <i>S. Salivarius</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. meyeri</i>	<i>S. xylosum</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viridans</i> 2, <i>Bifidobacterium</i> spp.
37	23	M	11 uni	R	R	1	2	0 mm	2 mm	N	A	N	N	7	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>
38	32	M	12 uni	B	B	2	-	0 mm	8 mm	N	A	N	N	4	<i>S. xylosum</i>	-	<i>S. chromogenes</i> <i>S. capitis</i>
39	64	F	45 uni	R	R	6	-	3 mm	2 mm	N	A	N	N	30	<i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. constellatus</i> , <i>H. parainfluenzae</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>A. viridans</i> 2, <i>H. parainfluenzae</i>
40	59	F	47 tri	R	R	1	1	2 mm	1 mm	N	A	N	N	18	<i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
41	59	F	45 uni	R	B	1	0	0 mm	1 mm	N	A	N	N	18	<i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
42	58	F	15 uni	R	R	1	0	2 mm	3 mm	S	A	N	N	20	-	-	<i>Micrococcus</i> spp.

N = número do caso clínico, **I** = idade, **S** = sexo (M-masculino, F-feminino), **Dente** = número do dente e anatomia (unirradicular, birradicular, trirradicular), **QUA REST** = qualidade da restauração (B-Boa, R-Ruim), **QUA OBT** = qualidade da obturação: (B-boa, R-ruim), **NUM ESP** = número de espécies de microrganismos por canal, **ESP PINO/OBT** = espaço vazio entre o pino e a obturação, **Limite Apical** = espaço entre a obturação e o forame apical (em mm), **Diam Lesão** = diâmetro da lesão (em mm), **FIS** = fistula (P-Presente, A-Ausente), **E** = Exudato pós-desobturação (A-ausente, H-hemorrágico, P-purulento), **DDR PREV** = se o paciente teve alguma dor neste dente (A-ausente, P-presente), **DDR PERC** = dor à percussão (A-ausente, P-presente), **TEP** = terapia endodôntica prévia (em anos). Microrganismos identificados na saliva na coroa e no canal radicular.

A frequência das características clínicas e radiográficas está apresentada de forma resumida nas Tabelas 6 e 7. A prevalência de todas as espécies microbianas isoladas na saliva, na coroa e no canal radicular estão listadas na Tabela 8.

Tabela 6. Características clínicas de 42 dentes com insucesso endodôntico.

Características	Frequência	Porcentagem
Dente		
11, 21	8	19%
12, 22	10	24%
13, 23	3	7%
14, 15, 25	6	14,5%
31, 41, 42	3	7%
34, 35, 44, 45	8	19%
43	1	2,5%
46, 47	3	7%
Anatomia		
unirradiculares	38	90,5%
birradiculares	1	2,5%
trirradiculares	3	7%
superiores	27	64%
inferiores	15	36%
Gênero		
Masculino	16	38%
Feminino	26	62%
Idade		
<30	5	12%
≥30	37	88%
Tempo de tratamento		
<4 anos	1	2,5%
4-10 anos	29	69%
>10 anos	12	28,5%
Qualidade da restauração		
Boa	18	43%
Ruim	24	57%
Dor prévia		
	5	12%
Dor à percussão		
	11	26%
Presença de fístula		
	6	14,3%
Exudato		
	7	16,5%

Tabela 7. Características radiográficas de 42 dentes com insucesso endodôntico.

Características	Número	Porcentagem
Tamanho da lesão		
1-4 mm	25	59,5%
5-10 mm	7	23,8%
>10 mm	10	16,7%
Limite apical da obturação		
0-2 mm do ápice	27	64%
3-5 mm do ápice	15	36%
Qualidade do tratamento		
Bom	16	38%
Ruim	26	62%
Presença de pino intraradicular	20	47,6%
Espaço entre o pino e a obturação	14	33%

Tabela 8. Frequência e porcentagem de aparecimento por caso de espécies microbianas isoladas da saliva, da coroa e do canal radicular de 42 pacientes com dentes associados ao insucesso endodôntico.

ESPÉCIES	Frequência (número) e Porcentagem (%) de aparecimento por caso		
	SALIVA	COROA	CANAL RADICULAR
Actinobacteria			
<i>Actinomyces meyeri</i>	-	3 (7,1%)	3 (7,1%)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	-	3 (7,1%)	5 (11,9%)
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Actinomyces viscosus</i>	-	6 (14,3%)	4 (9,5%)
<i>Actinomyces israelii</i>	-	2 (4,8%)	4 (9,5%)
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	3 (7,1%)	3 (7,1%)
<i>Propionibacterium granulosum</i>	-	1 (2,4%)	2 (4,8%)
<i>Bifidobacterium adolescentis 2</i>	-	1 (2,4%)	3 (7,1%)
Bacteroidetes			
<i>Prevotella buccae</i>	-	1 (2,4%)	2 (4,8%)
<i>Prevotella intermedia</i>	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Capnocytophaga spp.</i>	-	2 (4,8%)	1 (2,4%)
Firmicutes			
<i>Enterococcus faecalis</i>	13(43,3%)	12 (28,6%)	14 (33,3%)
<i>Enterococcus faecium</i>	5(16,7%)	-	1 (2,4%)
<i>Streptococcus sanguis</i>	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	1 (2,4%)	-
<i>Streptococcus mitis 1</i>	-	15 (35,7%)	9 (21,4 %)
<i>Streptococcus constellatus</i>	-	3 (7,1%)	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	-	1 (2,4%)	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	3 (7,1%)	3 (7,1%)
<i>Streptococcus oralis</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	3 (7,1%)	2 (4,8%)
<i>Streptococcus acidominimus</i>	-	3 (7,1%)	2 (4,8%)
<i>Streptococcus lactis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Streptococcus intermedius</i>	-	1 (2,4%)	-
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	-	2 (4,8%)
<i>Eubacterium limosum</i>	-	4 (9,5%)	3 (7,1%)
<i>Micrococcus lentus</i>	-	1 (2,4%)	2 (4,8%)
<i>Gemella morbillorum</i>	-	6(14,3%)	8 (19%)
<i>Gemella haemolysans</i>	-	4 (9,5%)	3 (7,1%)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	9(21,4%)	3 (7,1%)	7 (16,7%)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2 (4,8%)	-	1 (2,4%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (7,1%)	2 (4,8%)	4 (9,5%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6 (14,3%)	2 (4,8%)	2 (4,8%)
<i>Staphylococcus caprae</i>	1 (2,4%)	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Staphylococcus warneri</i>	1 (2,4%)	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-
<i>Neisseria spp.</i>	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Aerococcus viridans</i>	-	-	2 (4,8%)

Tabela 8. Frequência e porcentagem de aparecimento por caso de espécies microbianas isoladas da saliva, da coroa e do canal radicular de 42 pacientes com dentes associados ao insucesso endodôntico (cont.).

ESPÉCIES	Frequência (número) e Porcentagem (%) de aparecimento por caso		
	SALIVA	COROA	CANAL RADICULAR
Firmicutes			
<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>	-	2 (4,8%)	2 (4,8%)
<i>Veillonella</i> spp.	-	1 (2,4%)	-
<i>Clostridium botulinum</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Clostridium tetani</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	-	3 (7,1%)	1 (2,4%)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (2,4%)	2 (4,8%)	2 (4,8%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (7,1%)	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2 (4,8%)	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3 (7,1%)	-	1 (2,4%)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (2,4%)	2 (4,8%)	2 (4,8%)
<i>Serratia odorifera</i>	1 (2,4%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	1 (2,4%)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1 (2,4%)	-	1 (2,4%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	5 (11,9%)	1 (2,4%)	3 (7,1%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (2,4%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 (2,4%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Pasteurella</i> spp.	-	-	1 (2,4%)
Proteobacteria			
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	1 (2,4%)	-
<i>Haemophilus para influenzae</i>	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	-	1 (2,4%)	-
Fungi			
<i>Candida albicans</i>	16 (38,1%)	3 (7,1%)	1 (2,4%)

*Foram identificados na saliva apenas *Enterococcus* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e enterobactérias.

A prevalência dos gêneros isolados na saliva, na coroa e no canal radicular estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9. Prevalência de *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias isolados na saliva, e da microbiota das coroas e dos canais radiculares.

GÊNEROS	SALIVA	COROA	CANAL RADICULAR
<i>Staphylococcus</i> spp.	26 (61,9%)	13 (31%)	18 (42,9%)
<i>Streptococcus</i> spp.	-	21(50%)	14 (33,3%)
<i>Enterococcus</i> spp.	19(45,2%)	12(28,6%)	14 (33,3%)
<i>Actinomyces</i> spp.	-	10 (23,8%)	13 (31%)
<i>Gemella</i> spp.	-	10 (23,8%)	9 (21,4%)
<i>Micrococcus</i> spp.	-	2 (4,8%)	6 (14,3%)
<i>Propionibacterium</i> spp.	-	1 (2,4%)	4 (9,5%)
<i>Clostridium</i> spp.	-	2 (4,8%)	4 (9,5%)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	-	1 (2,4%)	4 (9,5%)
<i>Eubacterium</i> spp.	-	3 (7,1%)	3 (7,1%)
<i>Peptostreptococcus</i> spp	-	1 (2,4%)	3 (7,1%)
<i>Prevotella</i> spp.	-	2 (4,8%)	3 (7,1%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	-	2 (4,8%)	2 (4,8%)
<i>Aerococcus</i> spp.	-	-	2 (4,8%)
<i>Veillonella</i> spp.	-	1 (2,4%)	-
<i>Haemophilus</i> spp.	-	3 (7,1%)	1 (2,4%)
<i>Neisseria</i> spp.	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
<i>Capnocytophaga</i> spp.	-	2 (4,8%)	1 (2,4%)
Enterobactérias	9 (21,4%)	4 (9,5%)	5 (11,9%)
Bacilos não-entéricos	-	1 (2,4%)	3 (7,1%)
<i>Candida</i> spp.	16 (38,1%)	3 (7,1%)	1 (2,4%)

A figura 7 mostra número e porcentagem de espécies de microrganismos por canal radicular, sendo que 13 (31%) abrigavam apenas 1 espécie por canal radicular, 8 (19%) apresentavam 2 espécies, 2 (4,8%) apresentavam 3, 5 (12%) apresentavam 4, 5 (12%) apresentavam 5, 9 (21,4%) apresentavam 6 ou mais espécies por canal radicular. Deste modo, 31% das infecções persistentes estudadas foram monoinfecções sendo assim 69% das infecções foram consideradas polimicrobianas, ou seja, contendo mais de 2 espécies de microrganismos por canal radicular.

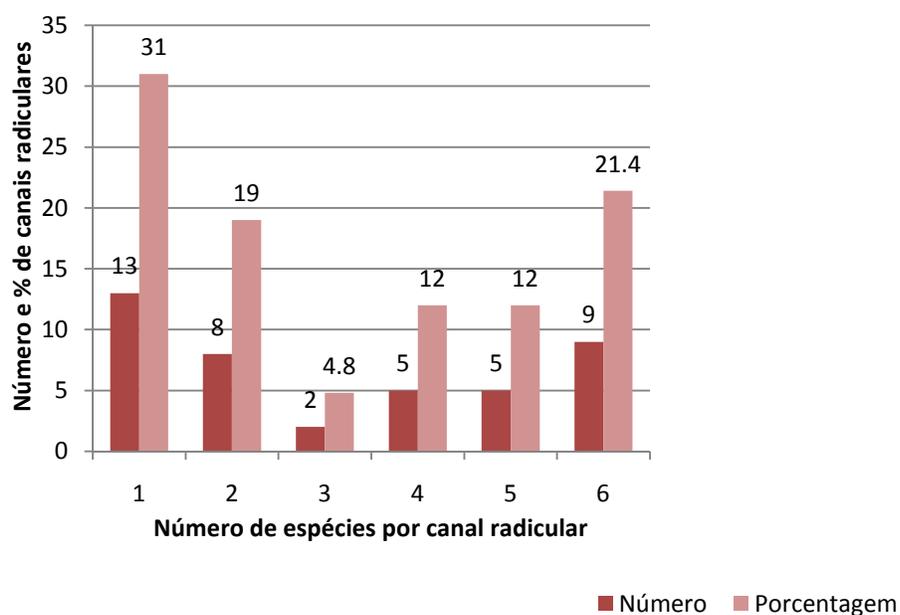


Figura 7. Número e porcentagem de espécies isoladas por canal radicular com insucesso endodôntico.

Das espécies microbianas isoladas nos canais radiculares, 83% eram anaeróbios facultativos, 17% anaeróbias estritas, predominantemente Gram-positivas (86,5%) e 14,5% Gram-negativas. Na coroa 88,7% eram anaeróbios facultativos e 85% Gram-positivos (Fig.8).

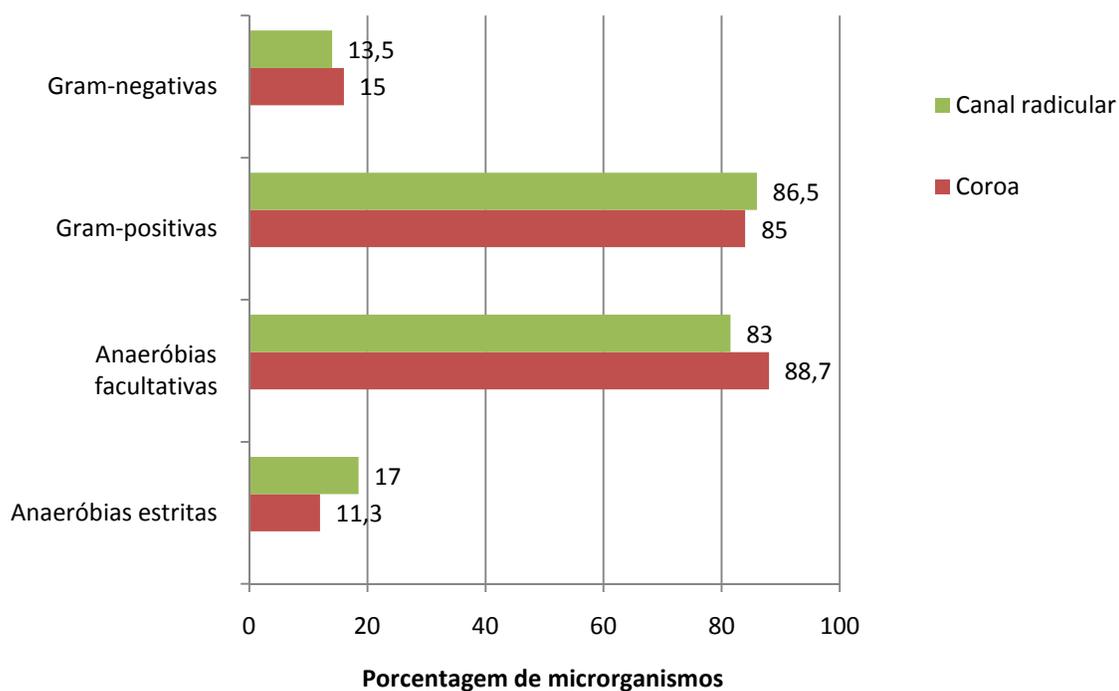


Figura 8. Frequência de microrganismos anaeróbios estritos, anaeróbias facultativas, Gram-positivos e Gram-negativos isolados na coroa e no canal radicular de 42 pacientes com dentes associados ao insucesso endodôntico.

Enterococcus spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram isolados em 33,3%; 43%; 2,4% e 12%, dos canais radiculares, em 28.6%; 31%; 7 % e 10%, das coroas e em 45,2%; 62%; 38% e 21,4% da saliva, respectivamente (Fig.9).

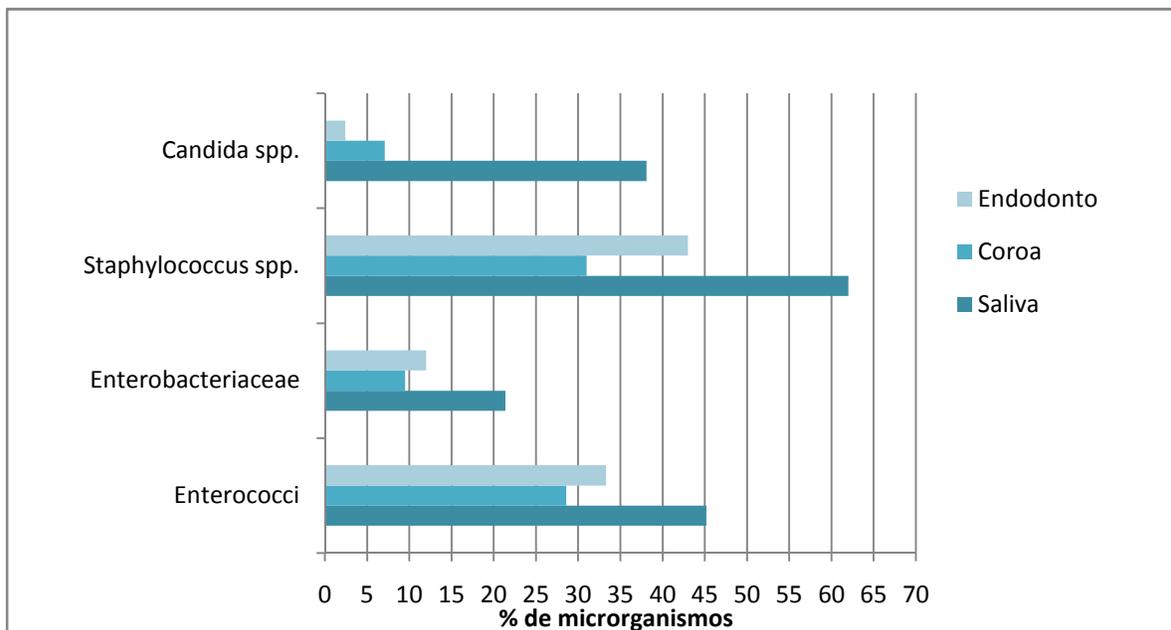


Figura 9. Prevalência de *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias identificados na saliva, na coroa e no canal radicular de pacientes com insucesso endodôntico.

Atividade antimicrobiana

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e a classificação baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) como S = Suscetível, I = Intermediário e R = Resistente das 14 espécies de *Enterococcus faecalis* testadas estão descritos nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10. Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos e classificação em suscetível, intermediário e resistente baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) dos *Enterococcus faecalis* (n=14) isoladas de canais radiculares.

Antibióticos	Casos Clínicos (n=14)															CIM
	1	3	5	7	8	10	21	28	31	34	35	37	40	41		
RI	16	R 16	R .75	S 256	R 16	R 4	R 1.5	R 256	R 6	R 4	R 12	R 256	R 3	I 1	S .016 - 256	
AC	1.0	S 1.0	S 1.0	S .75	S .023	S .016	S 1.0	S 1.0	S 1.5	S 2	S 2	S 2	S 1.0	S 1.5	S .016 - 256	
PG	32	R 3	S 8	S 3	S 32	R 32	R 2	S 32	R 2	S 256	R 6	S 3	S 3	S 4	S .002 - 32	
AZ	8	R 4	I 12	R 8	R 16	R 256	R 12	R 96	R 6	I 4	I 96	R 16	R 6	I 24	R .016 - 256	
MX	2	S .50	S .75	S .19	S 2	S 32	R .19	S .50	S .50	S .25	S .75	S .50	S .125	S .19	S .002 - 32	
DC	12	I .75	S 2	S 256	R 256	R 24	R 12	I 4	S .75	S 2	S 1.0	S 24	R .50	S .50	S .016 - 256	
XL	1.0	S 1.0	S 1.0	S 1.0	S .75	S .016	S .75	S 256	R 1.0	S 4	S 1.5	S 2	S .50	S 1.0	S .016 - 256	
CL	16	I 16	I 6	S 256	R 256	R 256	R 24	I 16	I 2	S 64	R 12	I 256	R 16	I 256	R .016 - 256	
CI	1.0	S 2	I -	- .75	S -	- -	- 1.0	S 1.5	I 3	I 32	R 2	I 6	R .75	S 1.0	S .002 - 32	
EM	-	- .25	S -	- 3	I -	- -	- 1.5	I 256	R 2	I 3	I 4	I 4	I 3	I 8	R .016 - 256	
VA	-	- 4	S -	- -	- -	- -	- 2	S 256	R 4	S 8	I 8	I 6	I 3	S 8	I .016 - 256	
TC	-	- .50	S -	- -	- -	- -	- 128	R .19	S .75	S 4	S .75	S 64	R 1.5	S 2.0	S .016 - 256	

S = Suscetível, I = Intermediário, R = Resistente, RI = Rifampicina, XL = Amoxicilina, PG = Benzilpenicilina, AZ = Azitromicina, MX = Moxifloxacina, DC = Doxicilina, AC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico, CL = Cloranfenicol, CI = Ciproflaxacina, EM = Eritromicina, VA = Vancomicina, TC = Tetraciclina.

Das 14 amostras de *Enterococcus faecalis* estudadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana, 100% foram sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e 92,8% foram sensíveis à amoxicilina e à moxifloxacina. Entretanto, 78,5% das cepas apresentaram-se resistentes à rifampicina e 71,4% à azitromicina. Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 11.

Tabela 11. Índice de Suscetibilidade (S), Suscetibilidade intermediária (I) e Resistência (R) antimicrobiana das espécies de *Enterococcus faecalis* e concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados respectivamente.

<i>Enterococcus faecalis</i> (n=14)						
Agentes antimicrobianos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			Índice de Suscetibilidade		
	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *	Intervalo de CIM	S	I	R
Rifampicina (RI)	6	256	1 - 256	14,3%	7,2%	78,5%
Amoxic+ ac. Clav. (AC)	1,0	2	0,016 – 2	100%	-	-
Benzilpenicilina (PG)	4	32	2 - 256	64,3%	-	35,7%
Azitromicina (AZ)	12	96	4 - 256	-	28,6%	71,4%
Moxifloxacina (MX)	0,50	2	0,125 - 32	92,8%	-	7,2%
Doxiciclina (DC)	2	24	0,50 - 256	57,1%	14,3%	28,6%
Amoxicilina (XL)	1,0	2	0,016 - 256	92,8%	-	7,2%
Cloranfenicol (CL)	16	256	2 - 256	14,3%	42,8%	42,8%
Ciprofloxacina (CI)**	1,0	6	0,75 – 32	45,4%	36,4%	18,2%
Eritromicina (EM)**	3	8	0,25 - 256	10%	70%	20%
Vancomicina (VA)**	4	8	2 - 256	44,4%	44,4%	11,1%
Tetraciclina (TC)**	0,75	64	0,19 - 128	77,8%	-	22,2%

* CIM₅₀= concentração inibitória mínima incluindo 50% das amostras.

CIM₉₀= concentração inibitória mínima incluindo 90% das amostras.

**os antibióticos CI, EM, VA e TC foram testados com 5 cepas (CI), 4 cepas (EM) e 3 cepas (VA e TC).

Fatores de Virulência

As múltiplas colônias de *Enterococcus faecalis* estudadas apresentaram resultado positivo para os determinantes virulentos testados, com exceção dos fatores, *asa373* e *cylA*, os quais não foram detectados em nenhuma destas amostras. Os fatores de virulência *ace* e *gelE* foram detectados em 74/74 (100%) das colônias, *efaA* em 68/74 (92%), *asa* em 52/74 (70,3%) e *esp* em 62/74 (84%). Estes achados estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Fatores de virulência de colônias de *Enterococcus faecalis* isoladas do endodonto (E), coroa (C) e saliva (S).

Caso clínico	Colônias	ERIC-PCR	AP-PCR RW3A	ace	efaA	asa	asa373	cyfA	esp	gelE	Citolisina	Gelatinase	
8E	1	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	2	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	3	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
21E	4	2	1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	
	5	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	6	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	7	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	8	2	1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	
	9	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	10	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	11	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	12	2	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	
	28E	13	4	2	+	+	-	-	-	+	+	-	+
		14	4	2	+	+	-	-	-	+	+	-	+
31E	15	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+	
	16	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
	17	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
	18	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+	
	19	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
	20	1	6	+	-	+	-	-	-	+	-	+	
	21	1	6	+	-	+	-	-	+	+	-	+	
	22	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
	23	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
	24	1	6	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+

* Os métodos ERIC-PCR e AP-PCR foram classificados com números diferentes entretanto apresentam o mesmo perfil genético.

Tabela 12. Fatores de virulência de colônias de *Enterococcus faecalis* isoladas do endodonto (E), coroa (C) e saliva (S), (Cont.).

Caso Clínico	Colônias	ERIC-PCR	AP-PCR RW3A	ace	efaA	asa	asa373	cylA	esp	gelE	Citolisina	Gelatinase
34E	25	7	3	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	26	7	3	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	27	7	3	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	28	7	3	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	29	7	3	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	30	7	3	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	31	7	3	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	32	7	3	+	+	-	-	-	+	+	-	+
35E	33	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	34	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+
37E	35	5	4	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	36	5	4	+	+	+	-	-	+	+	-	+
40E	37	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	38	6	5	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	39	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	40	6	5	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	41	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	42	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	43	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	44	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
41E	45	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	46	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	47	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
8C	48	2	1	+	-	-	-	-	+	+	-	+

* Os métodos ERIC-PCR e AP-PCR foram classificados com números diferentes entretanto apresentam o mesmo perfil genético.

Tabela 12. Fatores de virulência de colônias de *Enterococcus faecalis* isoladas do endodonto (E), coroa (C) e saliva (S), (Cont.).

Caso Clínico	Colônias	ERIC-PCR	AP-PCR RW3A	ace	efaA	asa	asa373	cylA	esp	gelE	Citolisina	Gelatinase
31C	49	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	50	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	51	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	52	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	53	1	6	+	-	+	-	-	-	+	-	+
	54	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	55	1	6	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	56	1	6	+	+	+	-	-	+	+	-	+
35C	57	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
37C	58	5	4	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	59	5	4	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	60	5	4	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	61	5	4	+	+	+	-	-	+	+	-	+
40C	62	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	63	6	5	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	64	6	5	+	+	+	-	-	-	+	-	+
31S	65	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	66	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	67	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	68	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	69	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	70	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	71	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
	72	4	2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
36S	73	3	7	+	+	+	-	-	+	+	-	+
37S	74	5	4	+	+	-	-	-	+	+	-	+

* Os métodos ERIC-PCR e AP-PCR foram classificados com números diferentes entretanto apresentam o mesmo perfil genético.

Rep-PCR

Foram encontrados 7 diferentes tipos de genótipos quando comparadas entre si as amostras estudadas (Tabela 13). As porcentagens de cada genótipo estão descritos na Tabela 14.

Tabela 13. Relação de casos clínicos com os diferentes genótipos encontrados utilizando os *primers* ERIC1R e ERIC2.

Nº.caso clínico	Endodonto	Nº. das amostras	Coroa	Nº. das amostras	Saliva	Nº. das amostras
8	G2 (n=3)	1,2,3	G2 (n=1)	48	-	
21	G2 (n=9)	4,5,6,7,8,9,10,11,12	-		-	
28	G4 (n=2)	13,14	-		-	
31	G1 (n=10)	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,24	G1 (n=8)	49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56	G4 (n=8)	65,66,67,68, 69,70,71,72
34	G7 (n=8)	25,26,27,28, 29,30,31,32	-		-	
35	G1 (n=2)	33, 34	G4 (n=1)	57	-	
36	-		-		G3 (n=1)	73
37	G5 (n=2)	35,36	G5 (n=4)	58,59,60,61	G5 (n=1)	74
40	G6 (n=8)	37,38,39,40, 41,42,43,44	G6 (n=3)	62,63, 64	-	
41	G4 (n=3)	45,46,47	-		-	
Total (n=74)	n=47		n=17		n=10	

Tabela 14. Prevalência dos 7 tipos de genótipos utilizando os *primers* ERIC1R e ERIC2.

Sítios	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Endodonto n=47	12 (25,5%)	12 (25,5%)	-	5 (10,7%)	2 (4,3%)	8 (17%)	8 (17%)
Coroa n=17	8 (47%)	1 (6%)	-	1 (6%)	4 (23,5%)	3 (17,5%)	
Saliva n=10	-	-	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)	-	
Total n=74 (100%)	20 (27%)	13 (17,5%)	1 (1,3%)	14 (19%)	7 (9,5%)	11 (14,8%)	8(10,8%)

AP-PCR

Foram encontrados 7 diferentes tipos de genótipos quando comparadas entre si as amostras estudadas (Tabela 15). As porcentagens de cada genótipo estão descritos na Tabela 16.

Tabela 15. Relação de casos clínicos com os diferentes genótipos encontrados utilizando o *primer* RW3A.

Caso Clínico	Endodonto	No. das amostras	Coroa	No. das amostras	Saliva	No. das amostras
8	G1 (n=3)	1,2,3	G1 (n=1)	48	-	
21	G1 (n=9)	4,5,6,7,8,9,10,11,12	-		-	
28	G2 (n=2)	13,14	-		-	
31	G6 (n=10)	15,16,17,18,19,20,21,22,23,24	G6 (n=8)	49,50,51,52,53,54,55,56	G2 (n=8)	65,66,67,68,69,70,71,72
34	G3 (n=8)	25,26,27,28,29,30,31,32	-		-	
35	G6 (n=2)	33,34	G2 (n=1)	57	-	
36	-		-		G7 (n=1)	73
37	G4 (n=2)	35,36	G4 (n=4)	58,59,60,61	G4 (n=1)	74
40	G5 (n=8)	37,38,39,40,41,42,43,44	G5 (n=3)	62,63,64	-	
41	G2 (n=3)	45,46,47	-		-	
Total (n=74)	n=47		n=17		n=10	

Tabela 16. Prevalência dos 7 tipos de genótipos utilizando o *primer* RW3A.

Sítios	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Endodonto n=47	12 (25,5%)	5 (10,6%)	8 (17%)	2 (4,2%)	8 (17%)	12 (25,5%)	-
Coroa n=17	1 (5,8%)	1 (5,8%)	-	4 (23,5%)	3 (17,6%)	8 (47%)	-
Saliva n=10	-	8 (80%)	-	1 (10%)	-	-	1 (10%)
Total n=74 (100%)	13 (17,5%)	14 (18,9%)	8 (10,8%)	7 (9,5%)	11 (14,8%)	20 (27%)	1 (1,3%)

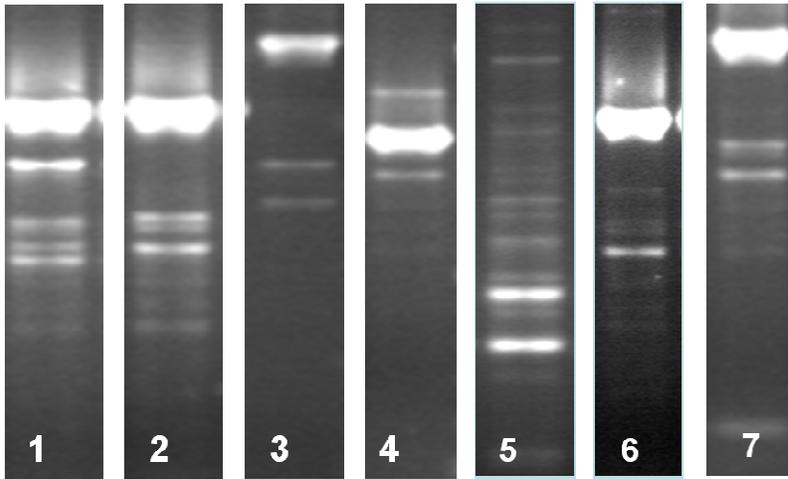


Figura 10. Escala dos diferentes genótipos visualizados através das bandas geradas pela amplificação por PCR com os primers específicos ERIC1 e ERIC2 para a diferenciação de *E. faecalis*.

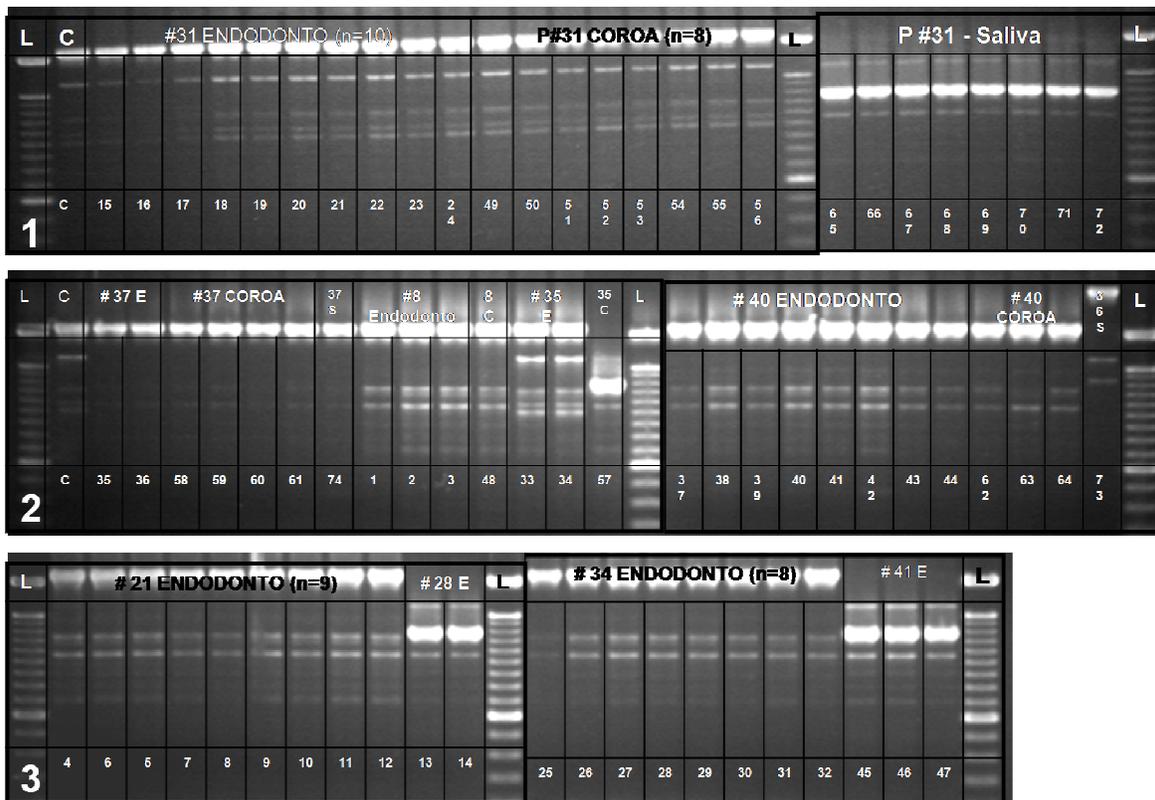


Figura 11. Eletroforese das bandas geradas pela amplificação por PCR com os primers específicos ERIC1 e ERIC2 para a diferenciação de 74 cepas de *E. faecalis* isoladas de diferentes sítios orais.

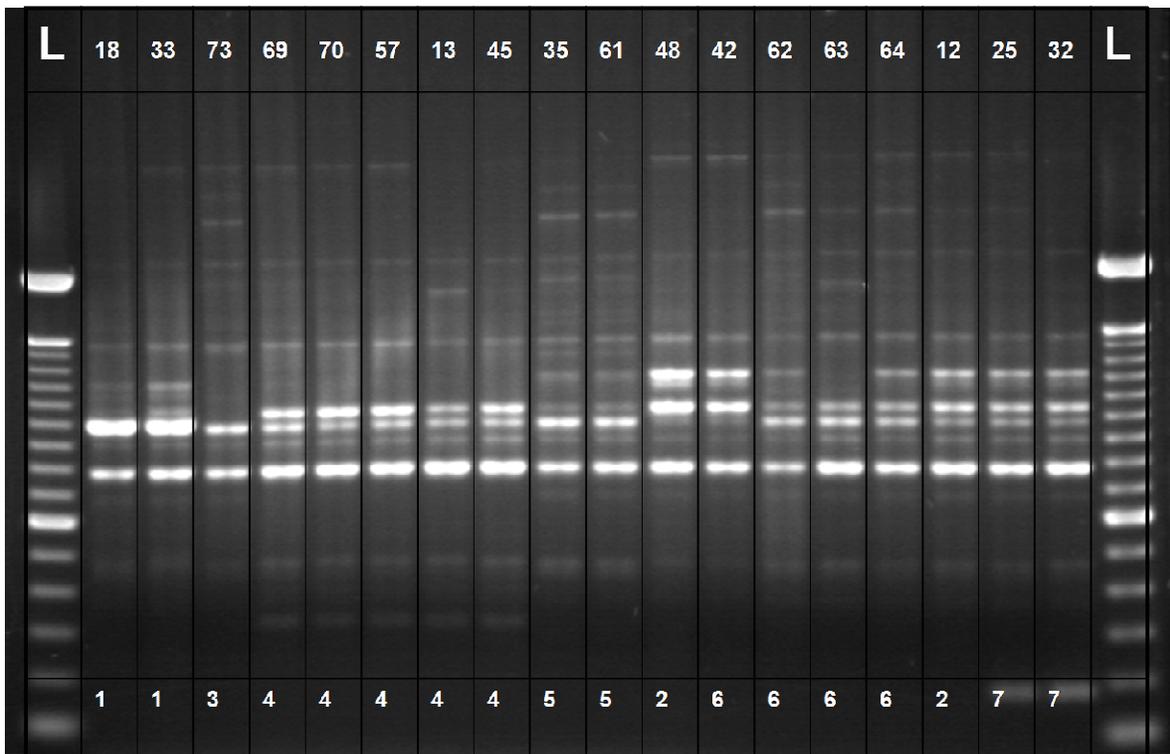


Figura 12. Eletroforese das bandas geradas pela amplificação por PCR com os primers específicos ERIC1 e ERIC2 mostrando a visualização dos diferentes genótipos.

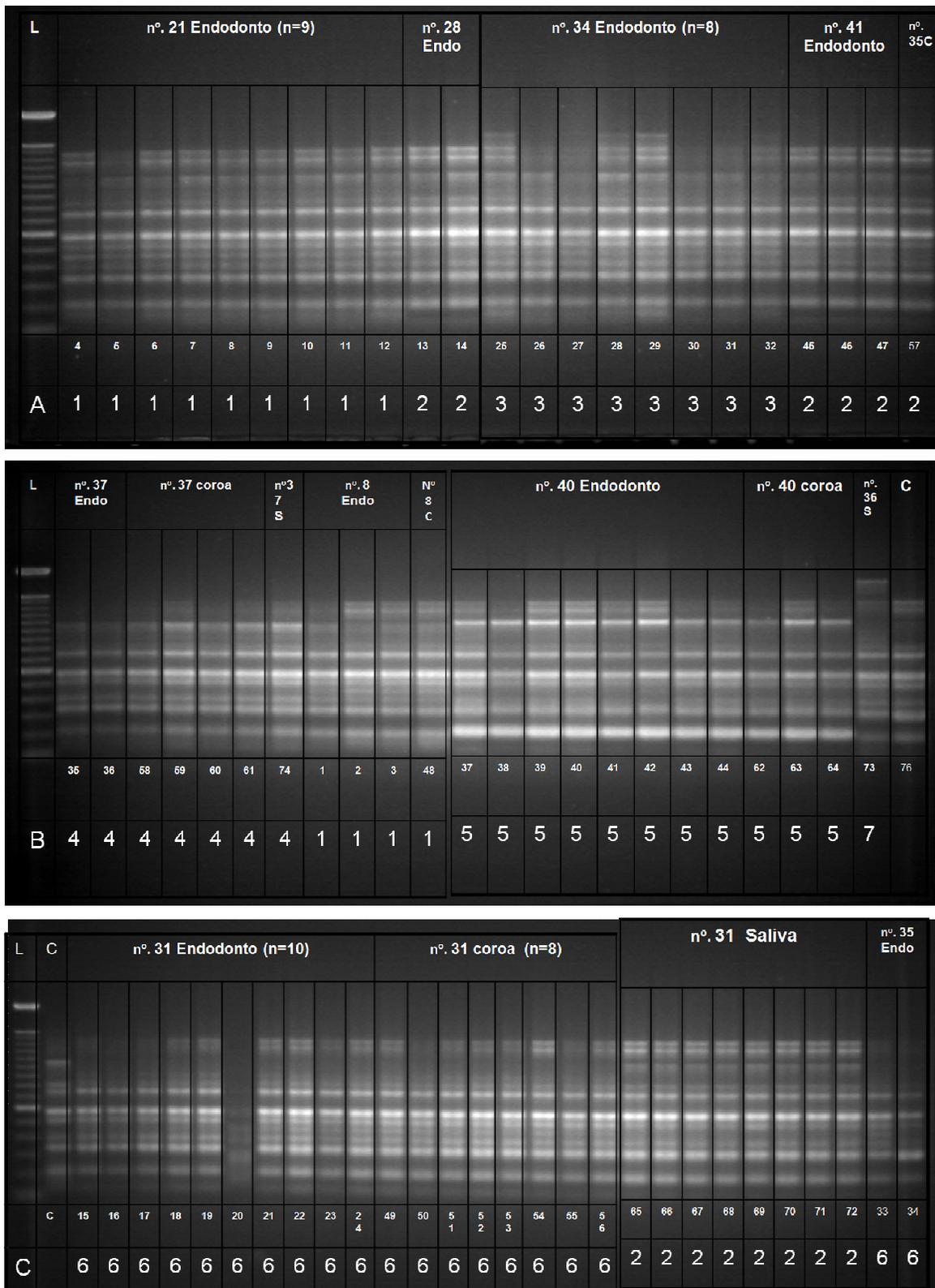


Figura 13. Eletroforese das bandas geradas pela amplificação por PCR com o *primer* RW3A específico para a diferenciação de 74 cepas de *E. faecalis* isoladas de diferentes sítios orais.

Tabela 17. Comparação dos resultados dos métodos utilizando os *primes* RW3A e ERIC para os genótipos de cepas de *E. faecalis* isolados.

Tipos	A	B	C	D	E	F	G
Genótipos	G6	G1	G7	G2	G4	G5	G3
Método de PCR	15,16,17,18,19, 20,21,22,23,24, 49,50,51,52,53, 54,55,56,33,34	1,2,3,4,5, 6,7,8,9, 10,11,12, 48	73	65,66,67,68, 69,70,71,72, 57,13,14,45, 46,47	35,36,58, 59,60, 61, 74	37,38,39,40, 41,42,43,44, 62,63,64	25,26,27, 28,29,30 31,32
RW3A							
Genótipos	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Método de PCR	15,16,17,18,19, 20,21,22,23,24, 49,50,51,52,53, 54,55,56,33,34	1,2,3,4,5, 6,7,8,9, 10,11,12, 48	73	65,66,67,68, 69,70,71,72, 57,13,14,45, 46,47	35,36,58, 59,60, 61, 74	37,38,39,40, 41,42,43,44, 62,63,64	25,26,27, 28,29,30 31,32
ERIC							

* As colunas A, B, C, D, E, F e G representam o mesmo perfil genético independente do método de PCR utilizado, apesar dos genótipos (G) serem classificados com números diferentes.

6. DISCUSSÃO

Um dos grandes questionamentos que ainda perduram na endodontia é por que dentes que aparentemente bem tratados endodonticamente, bem restaurados e sem presença de sinais e/ou sintomas clínicos apresentam lesões periapicais ? O conhecimento da microbiologia da saliva dos pacientes e do canal radicular dos dentes tratados endodônticamente com lesões periapicais é uma tentativa de se descobrir os fatores que causam o insucesso da terapia endodôntica.

Microorganismos isolados da saliva, da coroa e dos canais radiculares

As espécies isoladas dos canais radiculares são típicas da microbiota de dentes com insucesso endodôntico, com prevalência dos gêneros bacterianos: *Staphylococcus* (42,9%), *Streptococcus* (33,3%), *Enterococcus* (33,3%), *Actinomyces* (31%), *Gemella* (21,4%), o que corrobora com os achados da literatura (Engström, 1964; Möller, 1966; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, (1998); Peciuliene *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003 a,b; Siqueira & Roças, 2004; Roças *et al.*, 2004; Fouad *et al.*, 2005; Kaufman *et al.*, 2005; Sedgley *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006; Zolleti *et al.*, 2006; Schirmermeister *et al.*, 2007).

O protocolo utilizado nas coletas microbiológicas garantiu a cadeia asséptica durante e após o atendimento clínico, portanto a prevalência do gênero *Staphylococcus* spp. não representa neste estudo uma contaminação externa. Estes microrganismos têm sido isolados de lesões periapicais persistentes sem comunicação com a cavidade bucal (Tronstad *et al.* 1987; Wayman *et al.*, 1992). Cheung & Ho (2001) também identificaram *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., como sendo os microrganismos mais frequentemente isolados dos dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas.

Alguns trabalhos têm demonstrado a persistência de espécies de *Staphylococcus* spp. (Goldman & Pearson, 1969), *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. (Chávez de Paz, 2003; Gomes *et al.*, 1996b; Gomes *et al.* 2006) nas coletas após a realização do preparo químico-mecânico dos canais radiculares de dentes com lesões periapicais. Isto pode

significar que a microbiota encontrada no retratamento endodôntico pode ser remanescente da terapia endodôntica prévia e sua persistência pode ter mantido a lesão periapical, de forma crônica, ou então, em lenta regressão, permanecendo em equilíbrio com o sistema imunológico, mas podendo reagudizar e evidenciar ou não alguns sinais e sintomas clínicos.

Candida albicans foi isolada em 1 (2,4%) dos 42 canais estudados e estava presente em 38,1% da saliva dos pacientes, concordando com Sundqvist *et al.* (1998), Molander *et al.* (1998), Hancock *et al.* (2001) e Pinheiro *et al.* (2003b) que também isolaram *Candida albicans* com pouca prevalência nos canais radiculares. Egan *et al.* (2002) relataram ter encontrado uma correlação entre a presença de fungos na saliva e nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Nair *et al.* (1990a) e Ferreira *et al.* (2004) utilizando a microscopia eletrônica de varredura, detectaram a presença de fungos em canais de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais e relacionaram a presença desses microrganismos com o insucesso endodôntico. Siqueira & Sen (2004) esclarecem que os fungos são microrganismos eucariontes que podem estar participando das infecções endodônticas e possivelmente também são responsáveis pelas causas das periapicopatias. *C. albicans* também foi resistente a algumas medicações intracanaís utilizadas na endodontia, o que vem a explicar porque este microrganismo tem sido associado a casos de infecções endodônticas persistentes.

De acordo com as investigações anteriores da microbiota do insucesso endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003a,b) este estudo foi igualmente representado por bactérias anaeróbias facultativas (83%) e Gram-positivas (86,5%). Esta microbiota difere substancialmente dos canais radiculares com polpas necrosadas, que apresentam uma microbiota predominantemente anaeróbia, com equilíbrio de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Möller, 1966, 1992; Baumgartner, 1991; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996 a,b,c; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). Esses dados já foram confirmados por estudos anteriores sobre infecções de dentes com tratamento endodôntico associados a lesões periapicais (Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Rolph *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2003a; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Adib *et al.*, 2004).

O presente estudo isolou *Enterococcus faecalis* em 33,3% (14/42) dos canais radiculares, concordando com a literatura (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Adib *et al.*, 2004; Fouad *et al.*, 2005). Na literatura, *Enterococcus faecalis* é frequentemente o microrganismo mais isolado dos canais radiculares associados ao retratamento endodôntico e sua prevalência varia de 24 a 70% no método de identificação por cultura. Porém, Cheung & Ho (2001) e Rolph *et al.* (2001) não isolaram cepas de *E. faecalis* em seus estudos. Concordando com nosso trabalho, Fouad *et al.* (2005) isolaram 22% entre os casos de retratamento estudados, entretanto, de acordo com a literatura, era esperada uma maior prevalência deste microrganismo.

Esse trabalho mostrou que 31% das infecções persistentes estudadas foram monoinfecções, sendo 69% das infecções consideradas polimicrobianas, ou seja, contendo mais de 2 espécies de microrganismos por canal radicular. Estes achados estão de acordo com a literatura (Fabricius *et al.*, 1982, Sundqvist *et al.*, 1998; Figor *et al.* 2003; Pinheiro *et al.* 2003 a,b) apesar dos diferentes métodos de coleta das amostras utilizados nas pesquisas.

Com a utilização dos métodos moleculares para identificação microbianas novas espécies estão sendo detectadas nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico (Schirmer *et al.* 2009), apontando para um perfil polimicrobiano. No presente estudo, apesar de utilizarmos a cultura, observamos também este perfil, composto principalmente por bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, que são mais resistentes à terapia endodôntica (Gomes *et al.* 1996b, 2004).

Rôças *et al.* (2008) utilizando o PCR em estudo com pacientes alemães detectaram 47% de *E. faecalis* e 6% de *Candida albicans*. As maiorias dos casos estudados apresentaram mais de uma espécie de microrganismos, não sendo *E. faecalis* a espécie mais dominante. Muitas outras espécies foram detectadas e por isso iniciou-se um questionamento sobre o envolvimento do mesmo nas infecções persistentes. O mesmo foi observado por Gomes *et al.* (2008) que utilizando PCR detectaram *Enterococcus faecalis* em 78% dos casos, porém seguido dos *Peptostreptococcus micros* (51%). *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* também estavam presentes. Estes estudos recentes podem significar o início de uma mudança nos achados sobre a microbiologia relacionada ao insucesso endodôntico.

Kaufman *et al.* (2005) identificaram *E. faecalis* em casos de retratamento endodôntico com e sem lesão periapical, e relataram que são poucas as evidências de que as cepas são as únicas a causar o insucesso endodôntico. Por isso, pode ser cedo para direcionar a terapia endodôntica no intuito de erradicar um único microrganismo, o qual pode não ser o principal responsável pela recidiva da doença.

Sakamoto *et al.* (2008) utilizando métodos moleculares detectaram 25 novos filotipos, além de detectar filotipos não-identificados, os quais compunham uma significativa parte da microbiota. A maioria dos casos tinham muitas espécies, com uma média de 10 por canal. Com estes avanços nas metodologias empregadas nas pesquisas recentes, surgirão novos patógenos endodônticos incluindo bactérias ainda não-identificadas e espécies, diferentes de *E. faecalis*, que podem estar participando da etiologia do insucesso do tratamento endodôntico.

Por outro lado, Gomes *et al.* (2006) identificaram *E. faecalis* em 46,6% dos casos de insucesso pelo método de cultura, e em 76% através da análise por métodos moleculares das mesmas amostras, confirmando que *E. faecalis* é encontrado numa frequência ainda maior em casos de insucesso endodôntico. O mesmo trabalho encontrou *E. faecalis* na maioria (82%) dos casos de polpas necrosadas quando analisado pelo método molecular, enquanto pela cultura das mesmas amostras, o microrganismo foi raramente isolado, mostrando que o *E. faecalis* está presente na infecção primária, porém em pequena quantidade, não detectável pelo método da cultura. O crescimento dessa espécie pode ser favorecido por mudanças ecológicas no canal radicular após o preparo químico-mecânico, uso de medicações intra-canais ou obturação do canal radicular, facilitando a seleção de microrganismos, ou então, pelo tratamento em múltiplas sessões usando selamento coronário provisório, por isso detectamos uma microbiota mais resistente na infecção secundária.

O presente estudo identificou o *E. faecalis* como único microrganismo em 6 casos clínicos, corroborando com os achados de Sundqvist *et al.* (1998) e Pinheiro *et al.* (2003 a,b) e confirmando os relatos de Fabricius *et al.* (1982) que mostraram que *Enterococcus* apresentam a capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias. Além desses fatores, *Enterococcus faecalis* tem a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos

procedimentos químico-mecânicos (Love, 2001) e conseguem suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes, manterem-se na fase latente e voltar a crescer quando os nutrientes se tornarem disponíveis (Figor *et al.*, 2003). Esses nutrientes podem ser provenientes de fluidos teciduais da região periapical ou de infiltrações coronárias e podem servir de substrato para as cepas que sobreviveram à terapia endodôntica, mantendo a infecção intra-radicular. Estes microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio que é a medicação intracanal comumente utilizada para a desinfecção dos canais radiculares (Haapasalo & Orstavik, 1987). Todos esses fatores podem contribuir para a alta prevalência desses microrganismos em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais (Siqueira & Roças, 2004).

Quanto ao método de cultura utilizado em nosso estudo, foram isolados microrganismos viáveis em 100% das amostras de canais radiculares dos 42 pacientes estudados. Esta elevada taxa de microrganismos isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico pode ser devido ao uso de meios seletivos e não seletivos. Portanto, difere dos achados de Molander *et al.* (1998), Sundqvist *et al.* (1998), Peciulienė *et al.* (2000) e Pinheiro *et al.* (2003), os quais, não detectaram crescimento bacteriano em 26,6%; 55,6%; 20% e 15% dos casos de dentes com tratamento endodôntico prévio, respectivamente. Entretanto, a presença de culturas negativas não significa a ausência total de microrganismos. Métodos de identificação por PCR mostram que os microrganismos estão presentes, mas muitas vezes não estão viáveis dentro do canal radicular (Siqueira & Roças, 2004). Embora as técnicas de coleta e cultura microbiológicas utilizadas nestes estudos sejam adequadas para o cultivo de bactérias sensíveis ao oxigênio (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996 a,b,c) é possível que alguns microrganismos tenham sido perdidos durante a coleta microbiológica por estarem presentes em áreas inacessíveis à coleta, ou em quantidade muito pequena no canal radicular.

No presente estudo, não houve qualquer relação estatisticamente significativa entre a microbiologia e as características radiográficas. Pinheiro *et al.* (2003b) relatou observar mais de 3 microrganismos em canais mal-obturados, mostrando uma correlação estatisticamente significativa. De acordo com Sundqvist *et al.* (1998) e Pinheiro *et al.* (2003b) os dentes mal obturados possuem uma microbiota semelhante a uma infecção primária. Siqueira & Roças (2004) encontraram um maior número de espécies bacterianas

em canais onde a distância entre o material obturador e o ápice era maior que 2 mm quando comparado com canais obturados no limite de 2 mm ou menos do ápice. Além disso, em ambas as situações, os autores encontraram maior número de espécies bacterianas por canal, apesar da diferença das técnicas utilizadas para identificação microbiana.

Diferentemente dos métodos de coleta microbiológica já utilizada (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003a,b), este estudo coletou a guta-percha infectada do canal radicular durante a desobturação feita brocas de Gates-glidden e limas e, depois de desobturado o canal e o comprimento de dente estabelecido com o localizador foraminal foi realizada uma coleta adicional com cones de papel absorvente. Deste modo, a quantidade do material infectado coletado por essa técnica parece ser maior, pois não se elimina os microrganismos durante a remoção do material obturador.

Na análise estatística foi observada maior incidência de retratamento endodôntico nos incisivos laterais superiores 10/42 (24%), confirmando mais uma vez a influência da anatomia na desinfecção do sistema de canais radiculares.

Os resultados encontrados em nosso estudo mostram que *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias estão presentes na saliva dos pacientes submetidos ao retratamento endodôntico. Poucos estudos (Egan *et al.*; 2002) associaram a microbiota da saliva ao insucesso endodôntico, porém, corroborando com este estudo, Sedgley *et al.* (2005, 2006) detectaram *E. faecalis* na cavidade oral dos pacientes que estavam em tratamento endodôntico, principalmente nos casos onde havia uma comunicação dos canais com a cavidade bucal. Entretanto, muitos questionamentos ainda existem sobre as condições que levam as espécies de *E. faecalis* a infiltrar em dentes restaurados e tratados endodonticamente, e subseqüentemente contribuir para sua patogenicidade (Sedgley *et al.*, 2006).

A análise estatística mostrou que 24/42 (57%) dentes indicados para o retratamento endodôntico apresentavam restaurações consideradas ruins. De acordo com Swartz *et al.* (1983), dentes com restaurações coronárias impróprias ou ausentes apresentam um índice de sucesso significativamente menor quando comparado aos dentes com restaurações adequadas. Além disso, Pinheiro *et al.* (2004) associaram restaurações defeituosas ou ausentes com a presença de *Streptococcus* spp. e *Candida* spp. que são microrganismos encontrados na cavidade oral. Assim, Helin *et al.* (2002) e Hommez *et al.* (2002)

recomendam o selamento coronário definitivo como parte integrante do tratamento endodôntico para a obtenção do sucesso endodôntico. Do mesmo modo, o presente estudo detectou os mesmos microrganismos na saliva, na coroa e no canal radicular, sugerindo a importância da restauração definitiva e imediata ao tratamento endodôntico e se possível utilizada entre sessões do tratamento endodôntico. O sucesso do tratamento e do retratamento endodôntico conseqüentemente dependem, do controle da assepsia durante o tratamento, da máxima eliminação de microrganismos durante o preparo químico-mecânico, de uma obturação hermética e também da prevenção da recontaminação do canal radicular.

Segundo Saunders & Saunders (1994) e Siqueira (2001), o insucesso endodôntico ocorre devido a uma possível infiltração coronária. Poucos estudos clínicos *in vivo* (Egan *et al.*, 2002; Sedgley *et al.*, 2006) investigaram a microbiota da saliva, da coroa e do canal radicular. O presente estudo identificou a microbiota de diferentes sítios orais utilizando vários meios de cultura seletivos para detectar os microrganismos viáveis envolvidos no insucesso endodôntico. Entretanto, estes achados podem significar apenas uma coincidência em sua igualdade, pois o método de identificação por cultura não pode provar que esses microrganismos são idênticos, desta maneira foi planejada a investigação de cepas de *E.faecalis* utilizando alguns métodos moleculares.

Suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. faecalis* isoladas (n=14)

Segundo as recomendações da NCCLS, as espécies de *Enterococcus* spp. que são classificadas como suscetíveis a penicilina, ampicilina e amoxicilina (CIM < 8 µg/ml), necessitam de uma alta dose terapêutica para o tratamento de infecções enterocócicas sérias. Endocardites causadas por *Enterococcus* spp. requerem uma terapia combinada com alta dosagem de penicilina ou alta dosagem de ampicilina, ou vancomicina, associadas a gentamicina ou estreptomicina, para exercer ação bactericida.

Entre as cepas de *Enterococcus faecalis* testadas a amoxicilina + ácido clavulânico (100%) e amoxicilina ou moxifloxacina (92,8%) apresentaram melhor atividade antimicrobiana, quando comparada ao cloranfenicol e a rifanpicina (14,3%). De acordo com Sedgley *et al.* (2005) *E. faecalis* foram suscetíveis a ampicilina, benzilpenicilina,

gentamicina e vancomicina. 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. Logo, em pacientes de risco, ou quando indicada terapia antibiótica durante o retratamento endodôntico, os resultados do nosso trabalho suportam a escolha da amoxicilina + ácido clavulânico como primeira opção de droga terapêutica.

Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico com lesão periapical persistente e concluíram que os *E. faecalis* foram totalmente suscetíveis “*in vitro*” a amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, vancomicina e moxifloxacina. Delboni (2006) observou, na mesma população geográfica, certo aumento na resistência bacteriana ao estudar 8 espécies de *E. faecalis* isoladas de 30 canais com insucesso endodôntico, as quais foram 100% suscetíveis à amoxicilina + ácido clavulânico, porém 87,5% a amoxicilina e a moxifloxacina. O atual estudo apresentou poucas diferenças em relação ao anterior, sendo que as cepas de *E. faecalis* foram sensíveis a amoxicilina + ácido clavulânico (100%), seguido da amoxicilina (92,8%), da tetraciclina (77,8%) e da benzilpenicilina (64,3%). Entretanto, observou-se uma diminuição nos índices de suscetibilidade, mostrando que as cepas foram pouco suscetíveis ao cloranfenicol (14,8%), a tetraciclina (77,8%), a doxiciclina (57%) e a ciprofloxacina (45,4%).

Assim, pode-se observar que algumas cepas de *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso endodôntico estão tornando-se resistentes a maioria dos antibióticos, principalmente a amoxicilina, e estes índices podem aumentar ainda mais com uso indiscriminado dos antibióticos. Segundo Forbes *et al.* (1998), quando um microrganismo se torna menos suscetível a um determinado agente antimicrobiano, do que o que era anteriormente observado, ele está adquirindo uma resistência biológica a essa droga. Os autores explicaram que a resistência biológica não coincide necessariamente com a resistência clínica, que só é adquirida quando esses microrganismos deixam de ser suscetíveis à droga de tal forma que essa não seja mais efetiva clinicamente. Os autores ressaltaram que o desenvolvimento da resistência antimicrobiana é um processo evolutivo, e que é de fundamental importância o seu conhecimento e acompanhamento.

Desde os estudos de Pinheiro *et al.* (2004) a eritromicina e a azitromicina apresentaram baixa suscetibilidade, 28% e 14%, respectivamente. Neste estudo as cepas de *E. faecalis* não foram suscetíveis á azitromicina, sendo 71% da cepas resistentes a este antibiótico e a eritromicina foi efetiva a apenas 10% das cepas, sendo estes os antimicrobianos menos efetivos. Das espécies de *Enterococcus faecalis* estudadas 71% apresentaram-se resistentes quando testadas com o antibiótico azitromicina. Esse resultado está de acordo com os achados de Fass (1993) que mostrou a azitromicina com menor eficácia contra *Enterococcus* spp. Por outro lado, Vigil *et al.* (1997) estudaram o padrão de suscetibilidade de microrganismos isolados de lesões periapicais persistentes, e não encontraram evidências claras de resistência antibiótica significativa entre as cepas estudadas.

A moxifloxacina e a amoxicilina apresentaram um índice de suscetibilidade de 92,8% cada, frente às cepas de *E. faecalis* testadas, portanto não foi 100% eficaz, como demonstrou o estudo de Pinheiro *et al.* (2004), realizado anteriormente nesta mesma instituição. As concentrações MIC₅₀ e MIC₉₀ da moxifloxacina foram menores quando comparadas aos outros antibióticos testados, sendo também mais efetiva do que a ciprofloxacina, corroborando com os achados de Pinheiro *et al.* (2004), sendo assim, a moxifloxacina seria uma alternativa para os pacientes alérgicos as penicilinas. Porém, mais investigações são necessárias envolvendo um maior número de cepas de *E. faecalis* isolados de insucessos endodônticos, assim como, estudos clínicos utilizando a moxifloxacina quando indicada a antibioticoterapia na endodontia. A clindamicina, não é uma alternativa para pacientes alérgicos, pois não é indicada nas infecções com *E. faecalis*, por isso ela não foi testada em nosso estudo. Segundo a NCCLS, aminoglicosídeos (salvo em altas concentrações), cefalosporinas, clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprim podem parecer ativos *in vitro*, mas não são clinicamente eficazes e não deve ser relatado como sensíveis.

No presente estudo, a eritromicina foi testada contra 5 cepas de *E. faecalis*, sendo que 10% apresentarm-se suscetíveis, 70% suscetibilidade intermediária e 20% resistentes, com grande variação das CIMs (0,25 – >256 µg/ml) no crescimento de *Enterococcus faecalis*, como observado no trabalho de Nord & Wadström (1973). Esses resultados demonstraram que as espécies de *Enterococcus faecalis* isoladas nesse estudo necessitaram

de uma maior concentração de eritromicina para sofrer inibição. Estudos anteriores (Zeldore & Ingle, 1962; Engström, 1964; Matusow, 1981) não detectaram resistência a eritromicina entre as espécies de *Enterococcus* spp. isoladas dos canais radiculares. Entretanto, Heintz *et al.* (1975) detectaram sensibilidade a eritromicina em 96%, enquanto Stern *et al.* (1990) detectaram em 61,2% das cepas de *Enterococcus* spp. estudadas. Assim, foi possível observar que a CIM da eritromicina, quando testada contra *Enterococcus* spp., tem aumentado com o decorrer dos anos, havendo um aumento da resistência das cepas de *E. faecalis* testadas *in vitro*.

Amostras clínicas de *E. faecalis* isolados de canais radiculares com insucesso endodôntico apresentaram cepas multi-resistentes a antibióticos, o que nos alerta para o fato de que antibióticos podem ser ineficazes clinicamente. Portanto há uma necessidade de monitoração da resistência aos antibióticos, utilizando um número maior de espécies bacterianas para ter um conhecimento do padrão sempre atual de suscetibilidade aos antibióticos.

Fatores de Virulência das cepas de *E. faecalis* isoladas (n=74)

A questão da significância clínica deste estudo é saber se os enterococcus isolados do insucesso endodôntico possuem potenciais fatores de virulência. Segundo Sedgley *et al.* (2005), o papel dos enterococci associados às infecções endodônticas persistentes, ainda é duvidoso. Em seu estudo com 33 cepas de *Enterococcus* spp. endodônticos identificaram evidências genótípicas e fenotípicas de potenciais fatores de virulências, em especial, a produção de gelatinase. Nossos testes fenotípicos mostraram que 100% das colônias estudadas produziram gelatinase. Comparando com os relatos de Sedgley *et al.* (2005), cerca de 70% dessas amostras expressaram a gelatinase, sendo que 93% destas foram de cepas isoladas na infecção primária, e apenas 23 % da secundária.

Alguns estudos (Shankar *et al.* 2001, Eaton e Gasson 2001, Waters *et al.* 2003, Hubble *et al.* 2003, Kristich *et al.* 2004, Creti *et al.* 2004, Sedgley *et al.* 2005, Reynaud af Geijersstam *et al.* 2007) já mostraram que *E. faecalis* isolados possuem potenciais fatores de virulência. Primers para fatores de virulência, tais como, substâncias de agregação (asa e asa373), desinas de superfície (esp), ativador de citolisinas (*cylA*), gelatinase (*gelE*),

antígeno da endocardite (*efaA*), antígeno do colágeno (*ace*) já foram previamente estudados (Sedgley *et al.* 2005, Reynaud af Geijersstam *et al.* 2007).

Em nosso estudo, as múltiplas colônias de *E. faecalis* estudadas apresentaram resultado positivo para a maioria dos determinantes virulentos testados, com exceção dos fatores, *asa373* e *cylA*, os quais não foram detectados em nenhuma amostra. Os fatores de virulência *ace* e *gelE* foram detectados em 100% das colônias, *efaA* em 92%, *esp* em 84% e *asa* em 70%. Estes resultados corroboram com o estudo de Sedgley *et al.* (2005) que detectou os fatores *asa*, *ace*, *efaA* e *gelE* em 100% das amostras, o gene *esp* estava presente 61%, o *cylA* em 18%, sendo que o gene *asa373* não foi detectado em nenhuma amostra.

A alta prevalência de fatores de virulência em cepas de *E. faecalis* também foi relatada por Reynaud af Geijersstam *et al.* (2007) que analisaram amostras de Lituanos e Finlandeses e detectaram determinantes virulentos como *esp* (26%), citolisina (15%), *ace* (95%), *efaA* (100%), *gelE* (72%) e a produção de gelatinase (47%). Nossos resultados são semelhantes, porém as adesinas de superfície apresentaram maior porcentagem em nossas amostras (84%) até mesmo quando comparadas aos achados de Sedgley *et al.* 2005 (61%).

Em nosso estudo o gene *gelE* foi detectado em todas as amostras testadas. Segundo a literatura, a expressão do gene *gelE* contribui para o aumento da disseminação do *E. faecalis* em sítios de alta densidade (Waters *et al.* 2003) e foi associado ao aumento da adesão do *E. faecalis* à dentina *in vitro* (Hubble *et al.* 2003). Kristich *et al.* (2004) relataram que a expressão do *gelE* favoreceu a formação de biofilme de *E. faecalis in vitro*. Por outro lado, os testes fenótipos da citolisina confirmaram a sua ausência em todas as amostras.

A persistência dos *E. faecalis* em canais radiculares tratados pode estar associada à presença de alguns determinantes virulentos. Fatores de virulência como *efaA*, similar às adesinas de superfície encontradas em enterococos e *ace* (adesina do colágeno do Enterococo) foram prevalentes em nossos resultados, similar às pesquisas da área médica (Creti *et al.* 2004, Eaton & Gasson 2001). O gene *ace* pode facilitar a adesão do *E. faecalis* à dentina (Hubble *et al.* 2003).

O gene *esp* foi detectado em 84% das cepas, em contraste com relatos de 100% dos isolados em endocardite e bacteremias (Archimbaud *et al.* 2002). A proteína *esp* está associada com a colonização e a persistência dos *E. faecalis* nas infecções do trato urinário em ratos (Shankar *et al.* 2001).

Expressões das substâncias de agregação podem aumentar a adesão ao colágeno tipo I, mas não a do tipo IV (Rozdzinski *et al.* 2001). O produto de PCR que representa as substâncias de agregação, como as foram encontrados em todas as amostras testadas neste estudo. Relato sobre a incidência das substâncias de agregação em amostras clínicas tem sido contraditórias, alguns detectam alta prevalência em amostras clínicas comparadas com as amostras de indivíduos saudáveis, por outro lado outros relataram uma prevalência similar em ambos (Huycke & Gilmore 1995, Archimbaud *et al.* 2002).

A presença destes genes em amostras de outras espécies associada com a habilidade de enterococos de adquirir, acumular e compartilhar elementos extracromossômicos entre bactérias do mesmo gênero e de diferentes espécies indica que se deve incluir em estudos espécies outras que *E. faecalis* para avaliar corretamente a evolução da patogenicidade neste gênero e conseqüente risco para a saúde humana (Semedo *et al.* 2003).

Diferenciação das cepas de *E. faecalis* isoladas (n=74)

O trabalho de Versalovic *et al.* (1992) foi o primeiro a mostrar a sequência de REP e ERIC em diversas espécies bacterianas. O método ERIC-PCR é eficiente na diferenciação de espécies bacterianas. Em estudo piloto a mais alta porcentagem de diferenciação entre as cepas foram de 88%, porem este *primer* pode ser ainda mais efetivo quando diferencia bactérias Gram negativas (Sharple & Lloyd 1990). Este *primer* é espécie-dependente, pois vai depender do número de vezes que a mesma sequência aparece em cada espécie. Sharple e Lloyd (1990) mencionam que o ERIC-PCR, quando usados em diferentes espécies, apresenta bandas em comum em cada espécie sugerindo a presença de macadores específicos para cada espécie.

Assim, cepas de um mesmo sítio podem ser similares ou não. Foi observado na Tabela 12 que cepas de um mesmo sítio nem sempre expressaram os mesmos fatores de virulência, por exemplo, o sítio 21E possui cepas positivas e outras que são negativas para o gene *efaA*, o sítio 34E, apresentaram cepas positivas e outras negativas para o gene *asa*.

Deste modo, não sabemos ainda se os microorganismos da infecção persistente sobreviveram à terapia endodôntica ou se pertencem á microbiota da saliva, afinal o número de amostras testadas em um único sujeito foi insuficiente para esta afirmação.

Porém, este estudo é o pioneiro em observar o genótipo de múltiplas cepas de *E. faecalis* isoladas de diferentes sítios da cavidade oral.

Segundo a literatura, o método ERIC tem maior capacidade de diferenciação dos microrganismos quando comparado ao método AP-PCR, porém não tem boa reprodutibilidade. Nosso estudo mostrou que os diferentes métodos apresentaram os mesmos resultados quanto ao número e a classificação dos genótipos encontrados.

No método ERIC-PCR observou-se alguma variação no padrão apresentado pela amostra 63, mas pela análise através do *GelCompar* e pela confirmação utilizando o *primer* RW3A, a amostra 63 continuou sendo classificada no genótipo 6 (ERIC-PCR), pois em teste de reprodutibilidade apresentou 84% de similaridade, o que não é considerada uma diferença suficiente para classificá-la em outro genótipo. De acordo com os testes de reprodutibilidade realizados no piloto desta pesquisa, a porcentagem de 82% ou acima deste valor é considerada como mesmo genótipo.

Quando comparamos os resultados dos métodos de diferenciação de *E. faecalis* REP e AP-PCR pode-se observar certa similaridade nos resultados. Os métodos foram testados com as amostras clínicas e em seguida foi realizada a repetição dos testes para análise das amostras que variaram apenas 1-2 bandas, para que se pudessem confirmar estes achados. Sugere-se também uma análise através do *gelcompar* (programa de computador que lê e analisa as imagens geradas nos géis) para que os resultados possam basear-se na análise de porcentagens de similaridade e não apenas em interpretação visual.

De modo geral, o genótipo das múltiplas cepas de *E. faecalis* dos diferentes sítios estudados apresentou similaridade entre as amostras pertencentes a um mesmo sítio, ou seja, diversas colônias de um mesmo canal radicular apresentaram o mesmo genótipo. Assim, as cepas de *E. faecalis* presentes na infecção secundária podem ser as mesmas da infecção primária, podem ser oriundas da saliva, ou mesmo de ambas as origens.

São inúmeros os estudos envolvendo a microbiologia de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais buscando as causas do insucesso da terapia endodôntica, mas ainda se faz necessária a continuidade das pesquisas sobre o assunto para confirmarmos a origem destes microrganismos. Além disso, uma vez conhecida sua resistência frente aos procedimentos endodônticos realizados atualmente, possibilitaria uma melhora no combate ou prevenção da infecção persistente, elevando

assim o índice de sucesso do retratamento endodôntico. Portanto sugere-se que trabalhos futuros devam continuar correlacionando a microbiota de diferentes sítios orais no intuito de se esclarecer a origem da recontaminação dos canais radiculares.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos diversos métodos utilizados neste estudo e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram identificados pelo método de cultura nos canais radiculares, nas coroas e na saliva dos pacientes.
- Os gêneros microbianos mais frequentemente isolados das coroas e dos canais radiculares foram: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Gemella*.
- A microbiota dos canais de dentes tratados endodonticamente é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas.
- Foi classificado como monoinfecção 31% dos casos onde detectou-se apenas uma espécie microbiana por canal radicular e 69% dos casos foi considerada infecções polimicrobianas apresentando uma colonização bacteriana com 2 ou mais espécies.
- Não houve qualquer associação da microbiota com achados clínicos e radiográficos.
- As cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas foram 100% suscetíveis a amoxicilina + ácido clavulânico e 92,8% suscetíveis a amoxicilina e a moxifloxacina.
- Todas cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas (n=74) apresentaram determinantes virulentos, como fatores de aderência e a enzima gelatinase.
- No teste de tipagem genética das múltiplas cepas de *E. faecalis* observou-se certa similaridade no perfil genético das amostras, principalmente nas localizadas num mesmo sítio.

REFERÊNCIAS*

- Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J* 1990; 35: 50-60.
- Abou-rass M & Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31: 39-47.
- Ada Council of Scientific Affairs. Antibiotics use in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 648.
- Adib V, Spratt D, NG Y-L, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J* 2004; 37: 542-551.
- Allen RK, Newton CW, Brown CE. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *J Endod* 1989; 15: 261-266.
- Andrade EA, Passeri LA, Mattos-Filho TR. Prevenção da endocardite bacteriana – novas recomendações da American Heart Association. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1998; 52: 353-7.
- Andrade ED. *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas; 1999, 188 p.
- Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR. β -lactamase production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcilin, ticarcilin-clavulanate, cefoxitin, imipinem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis Bacteroides* isolates and 129 *Fusobacteria* from 28 U.S. centers. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1546-50.
- Appelbaum PC, Spangler SK, Shiman R, Jacobs MR. Susceptibilities of 540 anaerobic Gram-negative bacilli to amoxicilin, amoxicilin-BRL 42715, amoxicilin-clavulanate, temafloxacin, and clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1140-3.
- Baker K, Fotos PG. The management of odontogenic infections – a rationale for appropriate chemotherapy. *Dent Clin North Am* 1994; 38: 689-706.
- Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Antibiotic suscepibility of anaerobic bacteria from human oral cavity. *J Dent Res* 1985; 64: 1233-44.
- Barnard D, Davies J, Figdor D. Susceptibilities of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *Int Endod J* 1996; 29: 320-6.
- Baumgartner JC. Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. *Curr Opin Dent* 1991; 1: 737-43.
- Baumgartner JC, Falker WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380-383.
- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infection. *J Endod* 1999; 25: 413-5.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Bender IB, Seltzer S. Combination of antibiotics and fungicides used in treatments of the infected pulpless tooth. *J Am Dent Assoc* 1952; 29: 235-41.
- Bender IB, Seltzer S, Sotanoff W. Endodontic success-A reappraisal of criteria. Part II. *Oral Surg* 1966; 22: 790-802.
- Berger JO, Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res* 1973; 81: 163-6.
- Bergenholtz G, Lekholm U, Milthon R, Heden G, Ödesjö B, Engström B. Retreatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res* 1979; 87: 2147-24.
- Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with E-test. *Clin Infect Dis* 1993; 16: suppl 4, S367-70.
- Briggs PFA, Scott BJJ. Evidence-based dentistry: endodontic failure – how should it be managed? *Br Dent J* 1997; 183: 159-64.
- Brown DF. The E-test challenged with selected strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 465-8.
- Cavalleri G, Cuzzolin L, Urbani G, Benoni G. Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *J Chemother* 1989; 1: 101-2.
- Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci* 2007; 49: 161-6.
- Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. US, (1995) pp 1032-1141.
- 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: 500-508.
- Cheung GSP. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J* 1996; 46: 131-8.
- Cheung GSP, Ho MW. Microbiol flora of root canal treated teeth with associated asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 332-7.
- Citrön DM, Ostavari MI, Karlsson A, Goldstein EJC Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29, 2197-2203.
- Clewell DB & Dunny GM. Conjugation and genetic exchange in enterococci. In M. S. Gilmore (ed.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington D.C., 2002. p.265-300.
- Coburn PS, Hancock LE, Booth MC, Gilmore M. A novel means of selfprotection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolyisin. *Infect Immun* 1999; 67: 3339-47.
- Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolyisin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 2003; 5: 661-669.

- Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, *et al.* Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **J Med Microbiol** 2004; 53: 13–20.
- Cullmann W, Frei R, Krech T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. **Chemotherapy** 1993; 39(3), 169-74.
- Dahlén G, Möller AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, eds. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology** (1992) St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 444-75.
- Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. **Oral Microbiol Immunol** 1993; 8: 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: 309-12.
- Dajani AS, Bawdon RE, Berry MC. Oral amoxicilin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? **Clin Infect Dis** 1994; 18: 157-60.
- Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P *et al.* Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. **J Am Med Assoc** 1997; 277: 1794-1801.
- Davis IJ, Richards H, Mullany P. Isolation of silver- and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth. **Oral Microbiol Immunol** 2005; 20(3):191-4.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Profiling of *Propionibacterium acnes* recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol** 1992; 8: 248-254.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L Systemic diseases caused by oral microorganisms. **Endod Dent Traumatol** 1994; 10: 57-65.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. **Endod Dent Traumatol** 1995; 11: 142-9.
- Delboni MG. Identificação de microrganismos presentes na saliva, na coroa e no canal radicular de dentes associados ao insucesso endodôntico e suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* isolados dos canais radiculares. Piracicaba-SP: Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas - Dissertação de Mestrado.
- De Lorenzo JL. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, p. 274.
- Del vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, Mcleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, Lupski JR. Molecular Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* via Fluorophore-Enhanced Repetitive-Sequence PCR. **J Clin Microbiol**, 1995; 33: 2141-44.
- 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: 1628–1635.

- Egan MW, Sprat Da, Ng Y-L, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canal of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J* 2002; 35: 321-9.
- Engström B The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 87-106.
- Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G Correlation of positive cultures with prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 275-80.
- Ernest MA, Conte MV, Keudell KC. Antibiotic sensitivity patterns of facultative and obligate anaerobic bacteria from pulp canals. *J Endod* 1977; 3: 106-9.
- Estrela C, Leles CR, Hollanda AC, Moura MS, Pécora JD. Prevalence and risk factors of apical periodontitis in endodontically treated teeth in a selected population of Brazilian adults. *Braz Dent J* 2008; 19: 34-9.
- Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 134-44.
- Fass RJ. Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2080-6.
- Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005; 38: 372-380.
- Ferreira FAB, Ferreira AL, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *J Endod J* 2004; 37, 61-9.
- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation, survival growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol and Immunol* 2003; 18, 234-9.
- 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.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th edn. St Louis, MO, USA: Mosby, (1998) 1079 p.
- 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: 254.
- Friedman S, Lost C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a Glass Ionomer cement sealer. *J Endod* 1995; 21: 384-90.
- Friedman S, Stabholtz A Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 1: criteria for case selection. *J Endod* 1986; 12: 28-33.
- Fukushima H, Yamamoto K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod* 1990; 11: 534-8.

- Gill CJ, Pallasch TJ Clindamycin-associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal adverse drug reaction. *J Am Dent Assoc* 1981; 102: 507-9.
- Goldman M, Pearson AH Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 28: 897-905.
- Gomes BPFA (1995) *An investigation into the root canal microflora*. Manchester, UK: University of Manchester. PhD thesis.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994; 27: 291-298.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dentistry* 1996a; 24: 47-55.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996b; 29: 235-241.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996c; 29: 69-75.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 71-6.
- 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.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 247-53.
- Gorni FG, Gagliani MM. The outcome of endodontic retreatment: a 2-yr follow-up. *J Endod* 2004; 30: 1-4.
- Grad HA. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan* 1997; 90: 64-72.
- Greenberg RN, James RB, Marier RL, Wood WH, Sanders CV, Kent JN. Microbiologic and antibiotic aspects of infections in the oral and maxillofacial region. *J Oral Surg* 1979; 37: 873-84.
- Gutiérrez JH, Brizuela C, Villota E Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 1999; 32: 40-8.
- Haapasalo M, Ranta H, Ranta K Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983; 41: 19-22.
- Hancock HH III, 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: 579-86.
- Harn WM, Chen YHM, Yuan K, Chung CH, Huang PH Calculus like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 237-40.

- Harrison JW Antibiotics not always necessary. *J Am Dent Assoc* 1999; 130: 782.
- Heintz CE, Deblinger R, Oliet S Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *J Endod* 1975; 1: 373-6.
- Heling I, Gorfil C, Slutzky H, Kopolovic K, Zalkind M, Slutzky-Golbber I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures review and treatment recommendations. *J Prosth Dent* 2002; 87
- Hepworth MJ, Friedman S Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc* 1997; 63: 364-371.
- Hommeze GMG, Coppens CRM, De Moor RJG. Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings. *Int Endod J* 2002; 35: 680-689.
- Hommeze G, De Moor R. Endodontics and apical periodontitis. *Rev Belge Med Dent* 2005; 60: 9-30.
- 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): 121–126.
- Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM (1991) *Molecular Microbiol* (5): 825-834.
- Hunt DA, Meyer RA Continued evolution of the microbiology of oral infections. *J Am Dent Assoc* 1983; 107: 52-4.
- Hunt DE, King TJ, Fuller GE. Antibiotic susceptibility isolated from oral infections. *J Oral Surg* 1978; 36: 527-9.
- Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 1995; 34: 152–156.
- Imura N, Otani SM, Campos MJ, Jardim Junior EG, Zuolo ML. Bacterial penetration through temporary restorative materials in root-canal-treated teeth *in vitro*. *Int Endod J* 1997; 30: 381-5.
- Ida RD, Gutmann JL Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 199-203.
- Iwu C, Macfarlane TW, Mackenzie D, Stenhouse D The microbiology of periapical granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 502-5.
- Jacinto RC, Gomes BPF, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18, 285-92.
- Jacobs MR, Spangler SK, Appelbaum PC Beta-lactamase production, beta-lactam sensitivity and resistance to synergy with clavulanate of 737 *Bacteroides fragilis* group organisms from thirty three US centers. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 361-70.
- Johnson CC Susceptibility of anaerobic bacteria to β -lactam antibiotics in the United States. *Clin Infect Dis* 1993; 16: Supp 4, S371-6.

- Kaçmaz B, Aksoy A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int J Antim Agents* 2005; 25: 535-38.
- 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.
- Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005; 31: 851-6.
- Kiryu T, Hoshino E, Iwaku M. Bacteria invading periapical cementum. *J Endod* 1994; 20: 169-172.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response therapeutic and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004; 7: 822-30.
- Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; 186: 154–163.
- Lage-Marques JL Análise radiográfica da qualidade do tratamento endodôntico e suas alterações. *Rev Bras Odontol* 1996; 53: 11-5.
- Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 318-322.
- Lewis RD, Block RM Management of endodontic failures. *Oral Surg* 1988; 66: 711-21.
- Lin ML, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 11: 603-11.
- Lin ML, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod* 1992; 18: 625-7.
- Lomçah G, Sem BH, Çankaya H. Scanning electron microscopy observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 70-6.
- Lopes HP, Siqueira Jr. JF, Elias CN Retratamento endodôntico. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, (1999) p.497-538.
- Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34: 399-405.
- Magura ME, Abdel HK, Brown CE, Newton CW. Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study. *J Endod* 1991; 17: 324-31.
- Makinen PL, Clewell DB, An F, Makinen KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ('gelatinase') from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J Biol Chem* 1989; 264: 3325–3334.
- Malooley J, Patterson SS, Kafrawy. Response of periapical pathosis to endodontic treatment in monkeys. *Oral Surg* 1979; 47: 545-54.
- Matusow RJ. Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assesment of antibiotic effectiveness against microbes isolated from intact teeth. *Oral Surg* 1981; 52: 187-96.

- Mendes CMF, Sader H, Sinto S, Oplustil C, Melchers W. Avaliação de dois métodos moleculares para tipagem epidemiológica de cepas de *Acinetobacter baumannii* responsáveis por surto de infecção hospitalar. *J Bras Patol* (1999) 35: 146-51.
- Miranda VC. Identificação de microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico, com especial referência aos estreptococos. *Rev Fac Farm Odontol Araraquara* 1969; 3: 73-95.
- Moening JE, Nelson CL, Kohler RB. The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47: 976-85.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
- Molander A, Reit C, Dahlén G. Microbiologic evaluation of clindamycin as root 18 canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1990 (23): 113–118.
- Möller AJR. *Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies*. Göteborg, Sweden (1966): Akademiförlaget.
- Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Ohman A, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-84.
- Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 226-9.
- Myers JW, Marshall FJ, Rosen S. The incidence and identity of microorganisms present in root canals at filling following culture reversals *Oral surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 28: 889-96.
- Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL. E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol* 1992; 63: 576-83.
- Nair PNR Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13: 29-39.
- Nair PNR, Schoeder HE Periapical Actinomycosis. *J Endod* 1984; 10: 567-570.
- Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1999; 87: 617-27.
- Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990a; 16: 580-8.
- Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod* 1990b; 16: 589-95.
- Nair PNR, Sjögren U, Schimacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post treatment follow-up. *Int Endod J* 1993; 26: 225-33.

- Nakano-Hasegawa M, Yammazaki S, Kaneda Y, Takizawa H, Maeda N, Nakamura J. The formation of biofilms by microorganisms isolated from infected root canals. *J Endod* 1999; 25: abst.PR 5.
- Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesion, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 2000 (9): 5218-24.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards – Normas de Desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana. (2005) 15^o suplemento informativo. M100-S15, vol 25, n 1, Table 2D, p. 55-58.
- Ngui-Yen JH, Bryce EA, Porter C, Smith JA. Evaluation of the E-test by using selected Gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2150-2.
- Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canals exudate of persistent apical periodontitis. *J Endod* 2000; 26: 221-4.
- Nord CE. Anaerobic bacteria in septicaemia and endocarditis. *Scand J Infect Dis* 1982; 31: 95-104.
- Nord CE, Heimdahl A. Cardiovascular infections: bacterial endocarditis of oral origin. Pathogenesis and prophylaxis. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 494-6.
- Nord CE, Wordström T. Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics *in vitro*. *Acta Odontol Scand* 1973; 31: 395-9.
- Oishi A, Yashioka T, Kobayashi C, Suda H. Electronic detection of root canal constrictions. *J Endod* 2002; 28: 361-4.
- Olsson-Liljequist B. E-test as a routine MIC tool for reference work. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 479-82.
- Palmer RJ, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol* 1997; 5: 435-40.
- Parillo JE. Endocarditis due to resistant viridans streptococci during oral penicillin chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1979; 300: 296.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26: 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: 429-434.
- Peciuliene V, Rimkuviene J, Maneliene R, Ivanauskaite D. Apical periodontitis in root filled teeth associated with the quality of root fillings. *Stomatologija* 2006; 8: 122-6.
- Peters DH, Friedel HA, Mctavish D. Azitromycin – a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 1992; 44, 750-99.
- Pinheiro ET, Gomes BPF, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003a; 36: 1-11.

- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003b; 18(2): 100-3.
- 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.
- Pitt Ford TR. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *Int Endod J* 1982; 15: 16-22.
- Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000 (68):2579-2586.
- Quality Assurance Guidelines. Chicago, American Association of Endodontics, (1987) pp 1-27.
- Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K *et al.* *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun* 1999; 67: 6067-75.
- Ranta K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod Dent Traumatol* 1988; 4: 269-72.
- Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clin Infect Dis* 1993; 16: supp 4, S390-400.
- Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995; 28: 12-8.
- Razavi A, Gmür R, Imfeld T, Zehnder M. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 248-51.
- Reader CM, Boniface M, Bujanda-Wagner S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. *J Endod* 1994; 20: 607-9.
- Reynaud af Geijersstam A, Culak R, Molenaar L, Chattaway M, Røslie E, Peciulienė V, Haapasalo M, Shah HN. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 87-94.
- Reit C. Decision strategies in endodontics: on the design of a recall program. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 233-9.
- Reit C, Dahlén G. Decision making analysis of endodontic treatment strategies in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1988; 21: 291-99.
- Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, Labrenz S, Narayana SVL, Weinstock GM, Murray BE, Hook M. *Ace* is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem* 1999; 38: 26939-45.
- Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008; 34: 926-31.

- Rôças IN, Siqueira-Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315-20.
- 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.
- Rosan B. Os estreptococos. In: Nisengarden RJ, Newman MG. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1997) p. 110-25.
- Rosenblatt JE, Brook I. Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1993; 16: supp 4, S446-8.
- Rotimi V, Krousheed M, Brazier JS, Jamal WY. *Bacteroides* species highly resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clin Microbiol Infect* 1999; 5, 166-69.
- Ruddle CJ Micro-endodontic nonsurgical retreatment. *Dent Clin North Am* 1997; 41: 429-55.
- Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 275-81.
- Sands T, Pynn BR, Katsikieris N. Odontogenic infections: microbiology, antibiotics and management. *Oral Health* 1995; June, 11-29.
- Sapico FL, Aldridge KE. What important problems remain in the areas of anaerobic bacteriology and anaerobic infections? *Clin Infect Dis* 1993; 16: supp 4, 451-2.
- Sapico FL, Sarma RJ. Infective endocarditis due to anaerobic and microaerophilic bacteria. *West J Med* 1982; 137: 18-23.
- Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis* 1993; 6: 269-75.
- Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10: 105-108.
- Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. Mechanisms of microbial disease. 3th edition, Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 1999.
- Scheld WM, Strunk RW, Balian G, Calderone RA. Microbial adhesion to fibronectin in vitro correlates with production of endocardites in rabbits. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1995 (180): 474-82.
- Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod* 2007; 33: 536-40.
- Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod* 2009; 35: 169-74.
- Sedgley CM, Buck G, Appelbe OK. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006; 32: 104-109.

- Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 95-101.
- 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.
- Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JJF, Tenreiro R, CRESPO MTB. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2569-2576.
- Shankar V, Baghdayan AS, Gilmore M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002; 417: 746-750.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore M. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193-200.
- Sharples GJ & Lloyd RG. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6503-6508.
- Siqueira Jr JF. Lesões periapicais podem ser infectadas? Visão crítica do problema. *Rev Bras Odontol* 1997; 54: 43-6.
- Siqueira Jr JF, Lopes HP. Microbiologia endodôntica. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, (1999) p.185-216.
- Siqueira Jr JF & Roças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 215-22.
- Siqueira Jr JF & Roças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 85-94.
- Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97:632-41.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008; 34: 1291-1301.
- Siren EK, Haapasalo PP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-5.
- Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16: 498-504.
- Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachinia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21: 277-282.
- Sjögren U., Fidgor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306.

- Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy-a five-year retrospective study. *Int Endod J* 1993; 26: 321-33.
- Stern MH, Dreizen S, Ott T, Levy BM. Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 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.
- 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.
- Hsieh SE. Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci *Microbiol Immunol* 2000; 33: 253-57.
- 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.
- Su YA, Sulavik MC, He P, Makinen KK, Makinen PL, Fiedler S, Wirth R, Clewell DB. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* 1991; 59: 415-20.
- Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28: 304-10.
- Sundqvist G, Fidgor D, Sjögren U. Microbiologic analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 86- 93.
- Sundqvist G & Reuterving CO. Isolation of *actinomyces israelii* from periapical lesion. *J Endod* 1980; 6: 602-6.
- Sundqvist G. Ecology of root canal flora. *J Endod* 1992a; 18: 427-430.
- Sundqvist G Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992b; 7: 257-62.
- Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. . *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 522-30.
- Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15: 13-18.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 (2002); 28: 12-55.
- Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA. Twenty years of endodontic success and failure. *J Endod* 1983; 9: 198-202.
- Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998; 31: 311-25.
- Tani N, Tominaga N, Osada T, Watanabe K, Umemoto T. Immunobiological activities of bacteria isolated from the root canals of postendodontic teeth with persistent periapical lesions. *J Endod* 1992; 18: 58-62.

- Teixeira. LM, Facklam RR. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, In: MURRAY, P.R. *et al.* (eds.) **Manual of Clinical Microbiology** 8ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003. p. 1178-81.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Sankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun** 2004 (72): 6032-6039.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C *et al.* The enterococcal surface protein, ESP, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl Environ Microbiol** 2001 (67): 4538-4545.
- Waar K, Van Der Mei HC, Harmsen JMH, Degener JE, Busscher HJ. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. **Microbiology** 2002; 148: 1863-70.
- Tomasz A Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. **N Engl J Med** 1994; 28: 1247-51.
- Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. **J Endod** 1990; 16: 566-9.
- Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth with refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol** 1990; 6: 73-7.
- Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extra-radicular endodontic infection. **Endod Dent Traumatol** 1987; 3: 86-90.
- Trowbridge HO, Stevens BH. Microbiologic and pathologic aspects of pulpal and periapical disease. **Curr Opin Dent** 1992; 2: 85-92.
- Van Nieuwenhuysen JP, Aouar M, D'Hoores W. Retreatment or radiographic monitoring in endodontics. **Int Endod J** 1994; 27: 75-81.
- Van Steenberg TJM., Van Winkelhoff AJ, Graaf FJ, Duerden BI Antibiotic Susceptibilities of black pigmented Gram-negative anaerobes. **Immunol Medical Microbiol** 1993; 6: 229-234.
- Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ *et al.* Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clin Infect Dis** 2002; 35: 570-575.
- Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontics infections. **Oral Microbiol Immunol** 2005; 20: 253-8.
- Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, Fowler CB, Bradley DV Jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. **J Endod** 1997; 23: 110-4.
- Walker (1992) Antimicrobial agents and chemotherapy. In: Slots J, Taubman MA, eds. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 242-64.

- Waltimo TMT, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MPP Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999; 32: 94-8.
- Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 96-101.
- Walton RE, Chiappinelli J Prophylactic penicilin: effect on posttreatment symptoms following root canal treatment of asymptomatic periapical pathosis. *J Endod* 1993; 19: 466-70.
- Wasfy Mo, McMahon K, Minah GE, Falker WA Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7, 100-5.
- Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol* 2003; 185: 3613-23.
- Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod* 1992; 18:152-55.
- Wexler HM. Susceptibility testing of anaerobic bacteria - the state of the art. *Clin Infect Dis* 1993; 16 Suppl 4: S328-33.
- Wexler HM, Molitoris E, Finegold SM. Effect of β -lactamase inhibitors on the activities of various β -lactam agents against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1219-24.
- Yamamoto K, Fukushima H, Tsuchya H, Sagawa H. Antimicrobial susceptibilities of *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* and *Bacteroides* isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1989; 15: 112-6.
- Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 2009; 42: 277-87.
- Zeldore BJ, Ingle JI Management of periapical infection: antibiotic sensitivity of bacteria isolated from root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962; 15: 721-6.
- Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 2006; 32: 722-6.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA PESQUISA CLÍNICA

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

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Identificação de microrganismos na saliva, coroa dental e canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico por método convencional e PCR e análise da suscetibilidade antimicrobiana e dos fatores de virulência dos *Enterococcus faecalis* isolados".

II. PROPOSIÇÃO

IDENTIFICAR MICRORGANISMOS NA SALIVA, NA COROA E NO CANAL RADICULAR DE PACIENTES QUE POSSUEM DENTES INDICADOS PARA O RETRATAMENTO ENDODÔNTICO E ANALISAR OS FATORES DE VIRULÊNCIA E A SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ALGUMAS ESPÉCIES BACTERIANAS ISOLADAS.

III. JUSTIFICATIVA

Este trabalho irá verificar se existe uma inter-relação entre a presença de microrganismos específicos na saliva e no material restaurador com aqueles encontrados nos canais radiculares, utilizando dois métodos de identificação microbiana: cultura e PCR.

Um maior estudo dos fatores clínicos e dos fatores de virulência de bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico poderia nos levar a uma melhoria das técnicas de combate à infecção e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento. O conhecimento do padrão de suscetibilidade antimicrobiana de espécies bacterianas isoladas desses canais poderia orientar, quando indicado, a correta administração do antibiótico.

Além disso, estudos sobre RETRATAMENTO ENDODÔNTICO fazem parte da linha de pesquisa do Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia de nossa disciplina, que foi montado graças ao financiamento da FAPESP. Já tivemos uma tese de mestrado e uma de doutorado concluídas estudando este tema (Pinheiro et al. 2003^a, 2003b, 2004, Gomes et al. 2004). Dessa maneira, o presente trabalho promoverá uma continuidade na linha de pesquisa.

II. PROCEDIMENTO DO EXPERIMENTO

Seleção dos pacientes

Serão selecionados 60 pacientes encaminhados à Clínica de Especialização de Endodontia com indicação de retratamento endodôntico. Será realizada uma radiografia do dente envolvido para verificar a presença de lesão periapical associada ao dente com tratamento endodôntico prévio, acompanhado ou não de sinais e sintomas, indicando a persistência da lesão por um período mínimo de 4 anos. Serão obtidos os dados relativos ao sexo, idade, doenças sistêmicas e uso de medicamentos. Os pacientes com doenças sistêmicas e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos não serão incluídos no estudo.

Aspectos clínicos e radiográficos

Para cada paciente serão anotados dados pessoais, história médica e história dentária. No exame subjetivo serão anotados dados sobre a condição atual do dente a ser retratado, quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo serão anotados dados tais como a presença de edema, de fístulas, presença ou não de restaurações no dente tratado endodonticamente, cáries e fraturas. Serão realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal.

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

Coleta de amostras

As coletas microbiológicas da saliva, da coroa e do canal radicular serão realizadas durante o retratamento endodôntico, ou seja, na mesma sessão odontológica. O paciente, logo no início do atendimento, receberá um frasco plástico estéril para dispensar o fluido salivar acumulado naquele momento. Em seguida, começarão os procedimentos clínicos para as coletas da face interna das restaurações ou pino-intraradicular. Após a colocação do isolamento absoluto, será feita a descontaminação do campo operatório e em seguida será coletada toda a guta-percha removida do canal radicular durante a desobturação. Será utilizado um localizador apical para medir o canal radicular e também uma radiografia para verificar a remoção do material obturador. Será feita uma irrigação do canal radicular com solução salina para remover qualquer resíduo remanescente do material obturador e deixar o canal úmido para a última coleta, na qual, cones de papel absorvente estéril serão introduzidos no comprimento de trabalho pré-estabelecido permanecendo nesta posição por 60 segundos. Este cone, normalmente é usado para secar o canal. A coleta de amostra é simples e faz parte da terapia endodôntica.

Após a coleta das amostras bacteriológicas, o dente em questão será retratado e restaurado pelo mesmo operador. Além disso, ao pacientes deste experimento serão acompanhados durante 2 anos.

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP as amostras coletadas serão processadas e analisadas pelo pesquisador. Algumas bactérias serão testadas quanto sua resistência a antibióticos.

Será realizada a Reação da Polimerase em Cadeia com Primer Arbitrário (AP-PCR) em todas amostras para complementar os resultados obtidos. Esta análise será realizada na Universidade de Iowa – EUA durante 6 meses.

V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS

O processo é indolor. Se o paciente sentir dor, esta não será devido à coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais.

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

(0xx19) 2106-5215 (laboratório de Endodontia) ou **(0xx19) 8138-8887** (celular dos pesquisadores).

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

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

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

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

VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO

Esta pesquisa não apresenta benefícios diretamente relacionados ao paciente, apenas identifica as bactérias encontradas nos canais radiculares de dentes com presença de uma lesão periapical. Isto poderá ajudar na escolha correta de um antibiótico e/ou medicação intracanal, que se necessário irá complementar o seu tratamento no combate a infecção persistente.

VII. INFORMAÇÕES

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

Também, os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a participação do indivíduo no experimento.

Os materiais e, ou dados coletados, ficarão à disposição dos sujeitos de pesquisa, sendo preservada a identidade dos mesmos.

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Se por acaso houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos.

Não há métodos alternativos para a obtenção das informações desejadas.

Neste estudo não há grupo controle ou placebo.

Se o paciente não ficar satisfeito com o tratamento ou o tratamento não for eficaz para o seu quadro clínico, ou seja, o paciente perder o elemento dental, ele será encaminhado para a Clínica Especialização de Implantodontia para continuar o tratamento odontológico nesta instituição.

O material será incluído em um banco de materiais biológicos que poderá ser utilizado em futuras pesquisas na área de Endodontia.

___ Sim, concordo com o armazenamento das amostras.

___ Não, concordo com o armazenamento das amostras.

VIII. RETIRADA DO CONSENTIMENTO

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

IX. CONSENTIMENTO INFORMADO

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

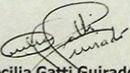
Piracicaba, ___ de _____ de 2008.

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP, endereçado a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, na cidade de Piracicaba/SP. Telefones/ fax: (0xx19) 2106-5349. Site: www.fop.unicamp.br/cep. E-mail: cep@fop.unicamp.br

ANEXO II – Certificado do comitê de ética

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Identificação de microrganismos na saliva, coroa dental e canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico por método convencional e PCR e análise da suscetibilidade antimicrobiana e dos fatores de virulência dos <i>Enterococcus faecalis</i> isolados", protocolo nº 007/2007, dos pesquisadores MARAISA GREGGIO DELBONI e BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 14/02/2007.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Identification of microorganisms isolated from saliva, crown and root canal of teeth with endodontic failure by culture and PCR and antimicrobial susceptibility virulence factors of <i>Enterococcus faecalis</i>", register number 007/2007, of MARAISA GREGGIO DELBONI and BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, 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 14/02/2007.</p>		
 Profa. Cecilia Gatti Guirado Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>		

APÊNDICE I - Meios de cultura

1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M (Bury, UK)

1.1. Descrição

Meio primário de isolamento capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios de maiores implicações clínicas.

As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento preto. Agentes específicos de estimulação de crescimento são os seguintes: cisteína para o *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp., pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia. 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 álcoois que poderiam inibir o crescimento bacteriano.

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 por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

1.3. Aparência

Vermelho devido a adição de sangue. O meio fica escuro (reduzido) mais tarde devido a adição de redutores.

1.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

1.5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

1.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido	1,0
Agar no. 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0

HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5
pH: 7,4 ± 0,2	

O meio FAA pode ser seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição de antibióticos seletivos.

2. FAA + ácido nalidíxico (X 091) – LAB M (Bury, UK)

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos.

Para o preparo de 500 ml de FAA, um vidro de pó de ácido nalidíxico (X091) é diluído em 5 ml de água destilada, e adicionado asepticamente ao meio esterilizado e resfriado a 47 °C. A concentração final de ácido nalidíxico é de 0,01 mg/ml.

3. FAA + ácido nalidíxico + vancomicina (X 090) - LAB M (Bury, UK)

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos. A concentração final de ácido nalidíxico é de 0,01 mg/ml, e da vancomicina é de 0,0025 mg/ml.

4. FAA + neomicina (X 015) - LAB M (Bury, UK)

Quando adicionado ao ágar-sangue, resultará em um meio que permite o crescimento de *Clostridium* e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios. A concentração final de neomicina é de 0,075 mg/ml.

5. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) - LAB M (Bury, UK)

5.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias. 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 Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio.

5.2 Preparo

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

5.3 Aparência

Amarelo claro.

5.4 Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C no escuro.

5.5 Inoculação

Se usado como meio de cultura com sangue, uma diluição mínima de 1:10 deve ser usada.

5.6 Incubação

37°C por 24-72 horas. Tubos bem fechados.

5.7 Fórmula

g/L

Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Agar no. 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4
pH: 7,4 ± 0,2	

APÊNDICE II - Câmara de anaerobiose

A câmara de anaerobiose consiste em uma câmara de incubação, feita de resina acrílica e tem a capacidade de armazenar placas de petri de 180 x 90 mm.

O acesso à cabine é feito através de portas com luvas de borracha.

Um controlador de temperatura digital indica e mantém uma temperatura constante no interior da cabine.

A cabine utiliza o sistema “Anotox” e o catalisador Palladium Deoxo “D” para manter anaerobiose estrita dentro da cabine e evitar a formação de metabólitos voláteis tóxicos. Grandes sachês ficam situados em frente do ventilador para permitir máxima exposição à atmosfera e evitar qualquer condensação de água no “Anotox” e catalisador.

A função do “Anotox” é purificar a atmosfera pela remoção de ácidos gordurosos voláteis e hidrogênio sulfúrico da atmosfera.

A função do catalisador Palladium Deoxo “D” é catalisar rastros de oxigênio dentro da câmara via hidrogênio, o qual também está dentro da câmara. O vapor de água produzido pelo catalisador é removido automaticamente por um sistema de controle de umidade. O catalisador Palladium Deoxo “D” e o “Anotox” devem ser trocados uma vez por ano no serviço de manutenção. Se eles ficarem muito úmidos durante o uso, devem ser removidos e secados. O “Anotox” que é feito de material plástico deve ser seco numa incubadora com temperatura de 37°C – 60°C por algumas horas. O sachê catalisador que é feito de aço inoxidável deve ser seco em forno a 160°C por uma ou duas horas.

O controle de anaerobiose no interior da cabine é feito com uma solução de azul de metileno ou outro indicador de redução de oxigênio.

A cabine apresenta um controle de umidade que permite que qualquer excesso de umidade condensada nas placas seja canalizada para fora da câmara.

A iluminação na cabine é feita por luzes fluorescentes.



Figura: Câmara de anaerobiose

APÊNDICE III - Protocolos das reações de PCR

1. Fatores de Virulência - De acordo com SEDGLEY *et al.* (2005)

<i>Genes</i>	<i>Pares de primers (5'-3')</i>	<i>pb (pares de base)</i>
<i>ace</i>	GGA ATG ACC GAGAAC GAT GGC GCT TGA TGT TGG CCT GCT TCC G	616
<i>efaA</i>	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTTCCTTCTTTGGC	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	932
<i>gelE</i>	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	405

Reação: total 25 µL

	10 X PCR buffer	2,5 µL
	Água MQ	18,5 µL
	dNTPs	0,5 µL
	MgCl ₂	1,25 µL
	Primer F	0,25 µL
	Primer R	0,25 µL
	Taq Polimerase	0,125 µL

	DNA	1,5 µL
--	-----	--------

Protocolo de temperatura:

	95°C	2 min
35 ciclos	94°C	20s
	58°C	45s
	72°C	1 min
	72°C	2 min
	4°C	hold

Obs.: termociclador *Biocycler*

2. Microorganismo: Ef16srRNA Ref.: Sedgley OMI 2005: 20: 10-19.

Primer F: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G
Primer R: CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC

Reação: total 25 µL

1.	10 X PCR buffer	2,5 µL
2.	Água MQ	18,5 µL
3.	dNTPs	0,5 µL
4.	MgCl ₂	1,25 µL
5.	Primer F	0,25 µL
6.	Primer R	0,25 µL
7.	Taq Polimerase	0,125 µL

8.	DNA	1,5 µL
----	-----	--------

Protocolo de temperatura:

	95°C	15 min
35 ciclos	94°C	20s
	68°C	45s
	72°C	15s
	72°C	10 min
	4°C	hold

Termociclador *Biocycler*

3. Microorganismo: *Enterococcus faecalis* Ref.: Dutka-Malen *et al.* 1995

Primer F: ATC AAG TAC AGT TAG TCT T

Primer R: ACG ATT CAA AGC TAA CTG

T_m = 47.1

T_m = 44.9

Reação: total 25 µL

	10 X PCR buffer	2,5 µL
	Água MQ	18,5 µL
	dNTPs	0,5 µL
	MgCl ₂	1,25 µL
	Primer F	0,25 µL
	Primer R	0,25 µL
	Taq Polimerase	0,125 µL

	DNA	1,5 µL
--	-----	--------

Protocolo de temperatura:

T_m = 45 °C - annealing - Harwood *et al.* 2004

	95°C	2 min
36 ciclos	94°C	30 seg
	45°C	1 min
	72°C	2 min
	72°C	10 min
	4°C	hold

Termociclador *Biocycler*

4. Microorganismo: *Enterococcus faecium* Ref.: Cheng *et al.* 1997

Primer F: TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG

Primer R: TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC

T_m = 57.2 °C

T_m = 56.5 °C

Reação: total 25 µL

9.	10 X PCR buffer	2,5 µL
10.	Água MQ	18,5 µL
11.	dNTPs	0,5 µL
12.	MgCl ₂	1,25 µL
13.	Primer F	0,25 µL
14.	Primer R	0,25 µL
15.	Taq Polimerase	0,125 µL

16.	DNA	1,5 µL
-----	-----	--------

Protocolo de temperatura:

T_m = 55 °C - annealing - Harwood *et al.* 2004

	95°C	2 min
36 ciclos	94°C	30 seg
	55°C	1 min
	72°C	2 min
	72°C	10 min
	4°C	hold

Termociclador *Biocycler*

APÊNDICE IV - Gel Eletroforese

A eletroforese em gel permite o fracionamento eficiente da ácidos nucleicos, e possui um importante papel analítico, e as vezes um papel preparativo. A matriz de separação usada é normalmente agarose e seus derivados. Os géis podem ser nativos (sem tratamento) ou desnaturantes (com a adição de urea, formamida etc.) para evitar a formação de estruturas secundárias, evitando a interferência na mobilidade através do gel.

Os ácidos nucleicos migram com base nas diferenças de peso molecular. De modo geral, todos ácidos nucleicos possuem aproximadamente uma densidade de carga por base, e a conformação da molécula em geral é semelhante. Portanto, a dificuldade de penetração no gel é proporcional ao peso molecular. A mobilidade é aproximadamente inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular.

Parâmetros afetam a mobilidade do DNA em gel eletroforese

1. Concentração de agarose: com a maior concentração de agarose, a separação de fragmentos maiores é reduzida. Menores concentrações facilitam a separação de fragmentos de maior peso molecular. A faixa de trabalho encontra-se entre 0,5% até 2% de agarose.
2. Gradiente de voltagem: expressa em V/cm. Consiste no ponto crítico na separação de fragmentos de DNA. Correndo um gel sob alto gradiente, reduz tremendamente a separação de fragmentos de alto peso molecular, apesar de ser aceitável usá-lo para checar a qualidade de digestão (teste mais rápido). Entretanto, a separação típica de digestões usando enzimas de restrição é melhor conduzida a baixos gradientes (1 a 2 V/cm) por toda a noite. O problema consiste na difusão dos fragmentos de baixo peso molecular (<1 kpb) e resultam em bandas menos distintas. Esses fatores devem ser considerados dependendo do uso e análise. Como aproximação, a distância de migração de um fragmento de DNA é proporcional ao log do seu tamanho. Ao plotar migração por peso num papel semi-log (antigamente!), obtinha-se uma curva padrão com o peso dos fragemtos e peso desconhecido. É sempre recomendável incluir padrões de peso molecular em todos os géis.

Preparação de Gel de Agarose:

Preparar gel de 1 % para analisar qualidade e quantidade do DNA

1. Pesar 1 g de agarose por 100 ml de tampão de corrida 1 x TAE (estoque 50x) num erlenmeyer e cobrir com vidro ou plástico e nunca papel alumínio.
2. Aquecer por cerca de 2 minutos em forno de microondas até ferver.
3. Misturar com cuidado, pois a solução ferve para fora do frasco.
4. Esperar a solução esfriar até cerca de 50°C (ponto que tolere encostar na sua pele), para evitar danos à forma do gel.
5. Verter o gel na forma fechada nas extremidades e com o pente em posição.
6. Esperar esfriar e remover bolhas com ponteiras.
7. Remover o pente com cuidado (levantar um lado primeiro com cuidado!)
8. Colocar o gel na cuba e completar o volume do tampão até cobrir o gel
9. Enquanto isso, preparar as amostras a serem carregadas no gel

10. Adicionar o volume necessário de amostra num tubo (1 a 5 µl), e acrescentar o tampão de amostra (1 µl) contendo “Blue juice”. A função do tampão da amostra é aumentar a densidade (com glicerol ou sucrose), e o “Blue juice” corre no gel com tamanho equivalente a 300 pares de base.
11. Transferir as amostras para os poços do gel
12. Conectar os eletrodos à fonte e ligar. Os ácidos nucleicos encontram-se no pH do tampão TAE carregados negativamente e migram para o positivo - correm para o vermelho.
13. Após a corrida, transferir o gel para uma bandeja contendo brometo de etídeo em água (10 µl de uma solução 10 mg/ml de brometo de etídeo em 500 ml de água) e agitar com cuidado por 20 minutos - BROMETO DE ETÍDEO É CARCINOGÊNICO E MUTAGÊNICO - USE LUVAS SEMPRE QUANDO MANIPULÁ-LO.
14. Observar sob luz ultravioleta no transiluminador. Observar a presença de rastros indicadores de RNA; formação de banda simples de DNA; comparar a intensidade das bandas das amostras; detectar a presença de degradação e/ou contaminação nas amostras.

Referências

- Doyle, J.J. e J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

APÊNDICE V – Confirmação dos resultados do método PCR

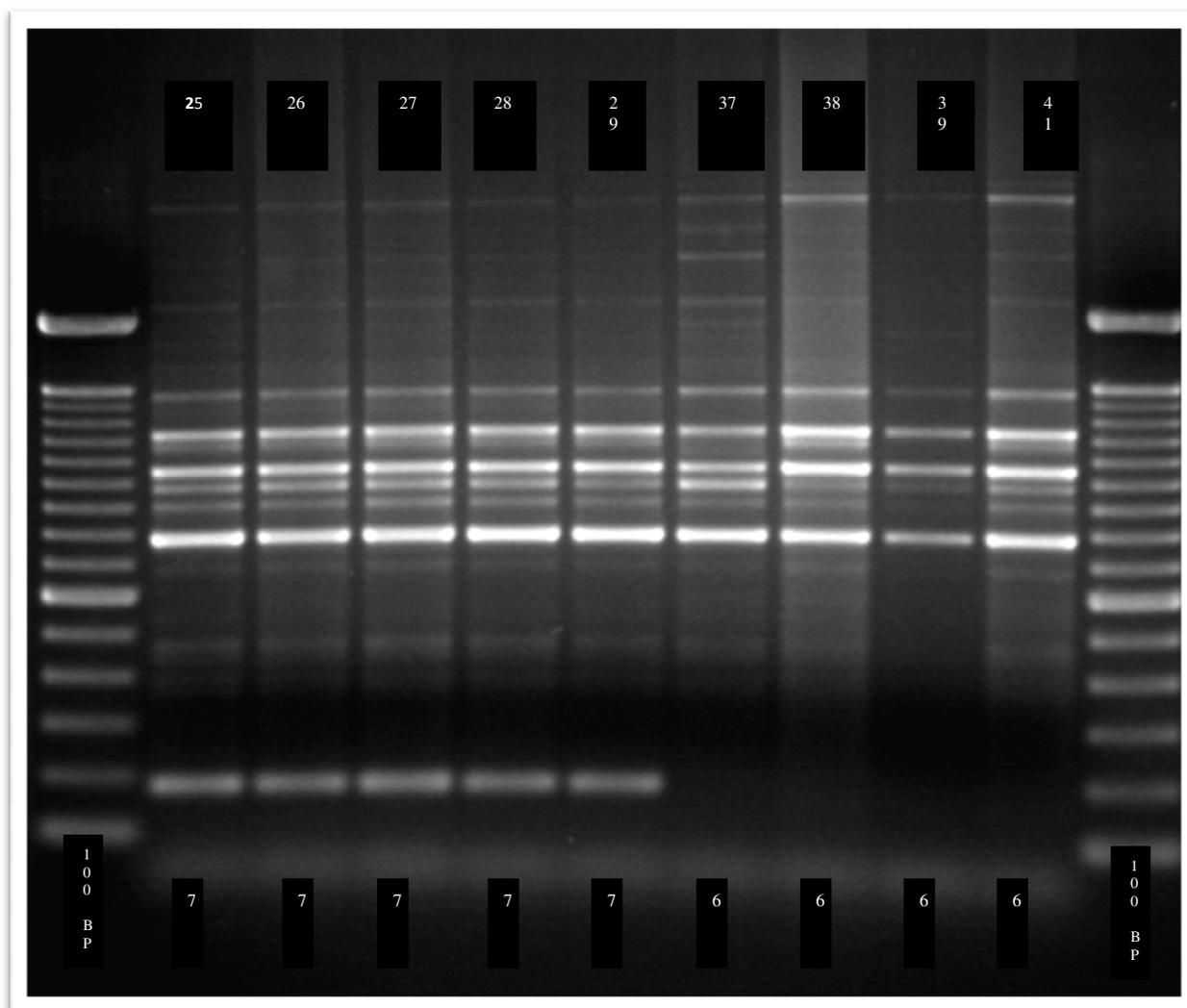


Figura 1. ERIC-PCR – confirmação dos resultados.

G7 e G6 possuem 2-3 bandas diferentes, mas o programa GelCompar e o método RW3A mostrou porcentagens que confirmam essas diferenças. Além disso, o método RW3A também confirmou que estes são 2 tipos de genótipos apesar do elevado grau de similaridade. A reprodutibilidade do método ERIC destas amostras foram testadas em duplicata.

Confirmação dos resultados utilizando o método ERIC-PCR.

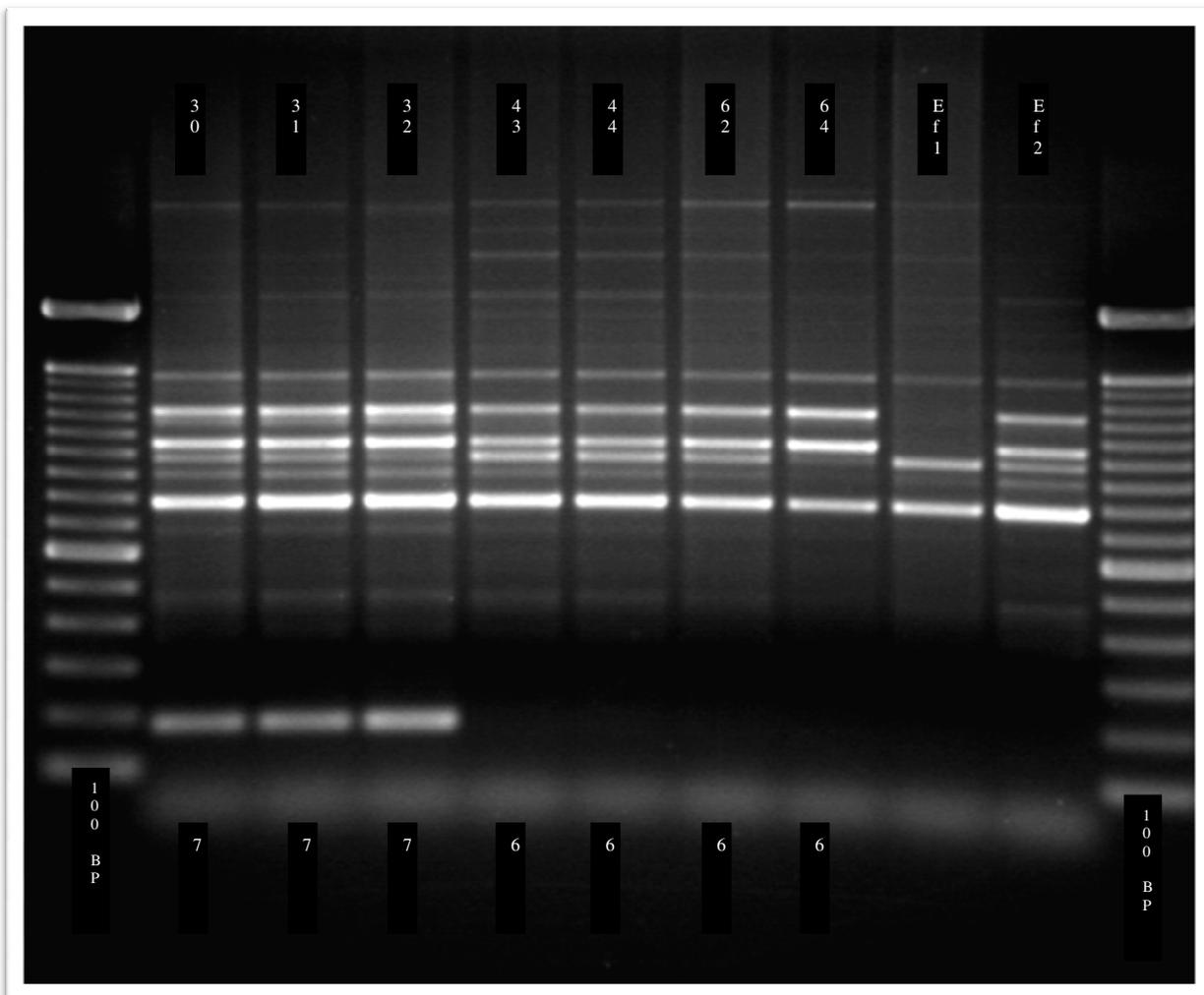


Figura 2. ERIC-PCR – confirmação dos resultados.

Confirmação dos resultados utilizando o método AP-PCR (RW3A).

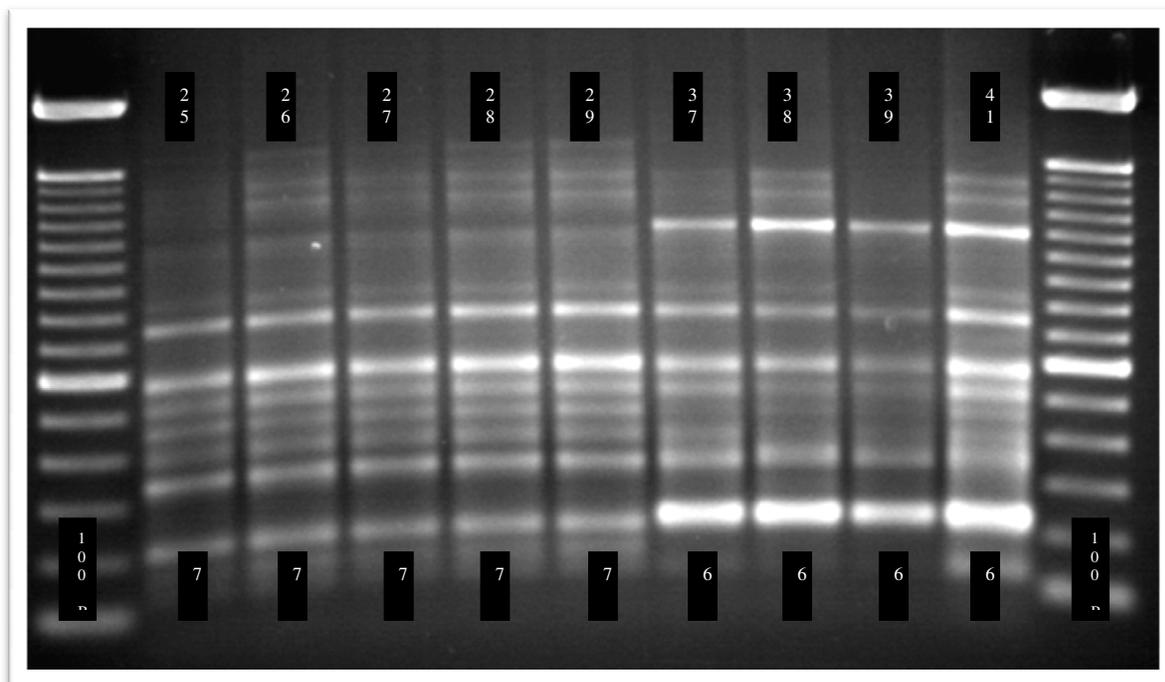


Figura 3. AP-PCR – confirmação dos resultados.

As bandas aparentam mais fracas nas amostras 37 e 39. O contraste mostrou que as bandas superiores estão presentes. O gel anterior de RW3A PCR também mostrou que as bandas superiores estão presentes, assim, baseando-se nestes achados as amostras 37, 38, 39 e 41 foram classificadas como G6.

Confirmação dos resultados utilizando o método AP-PCR (RW3A).

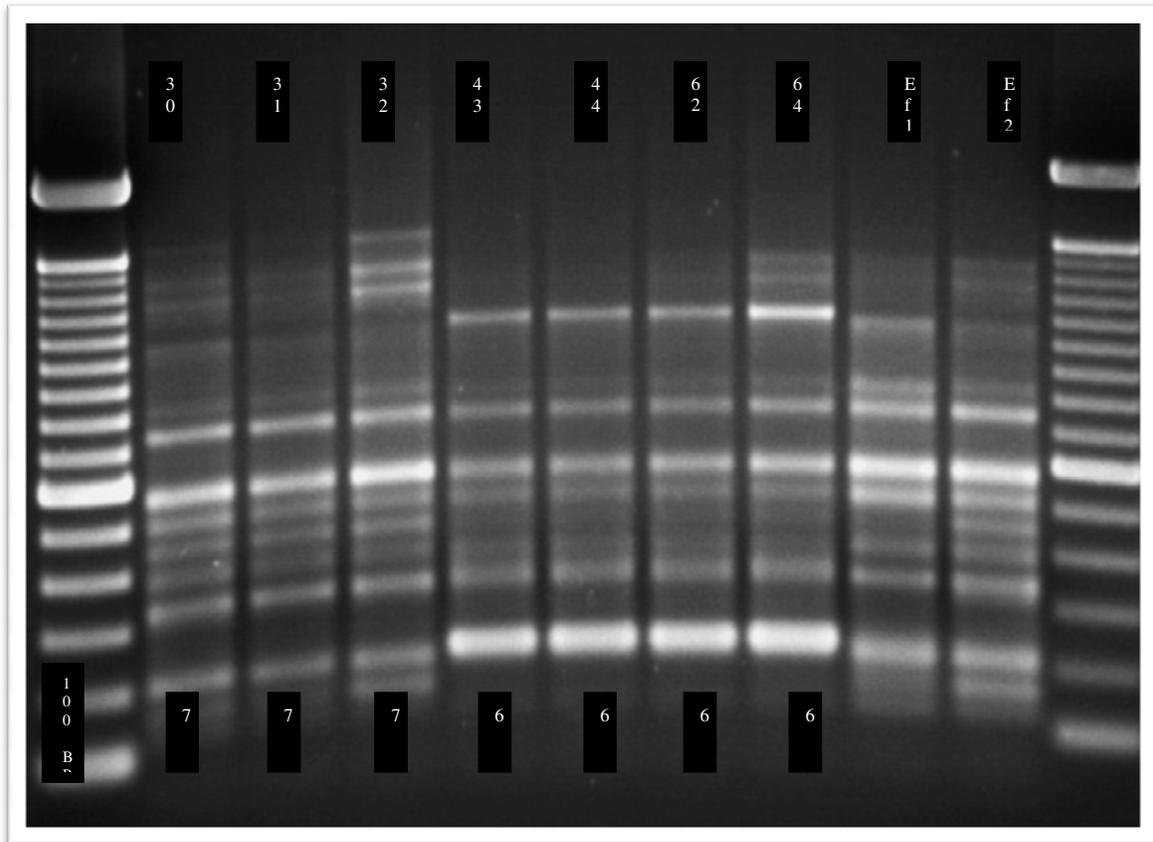


Figura 4. AP-PCR – confirmação dos resultados.

As bandas superiores estão claras nas amostras 43, 44 e 62. O aumento no contraste da imagem pode esclarecer que estas bandas estão realmente presentes na amostra 62. As impressões genômicas do gel anterior do método RW3A também confirma que estas bandas superiores estão presentes nas reações das amostras 43, 44 e 62.

Confirmação dos resultados utilizando o método ERIC-PCR.

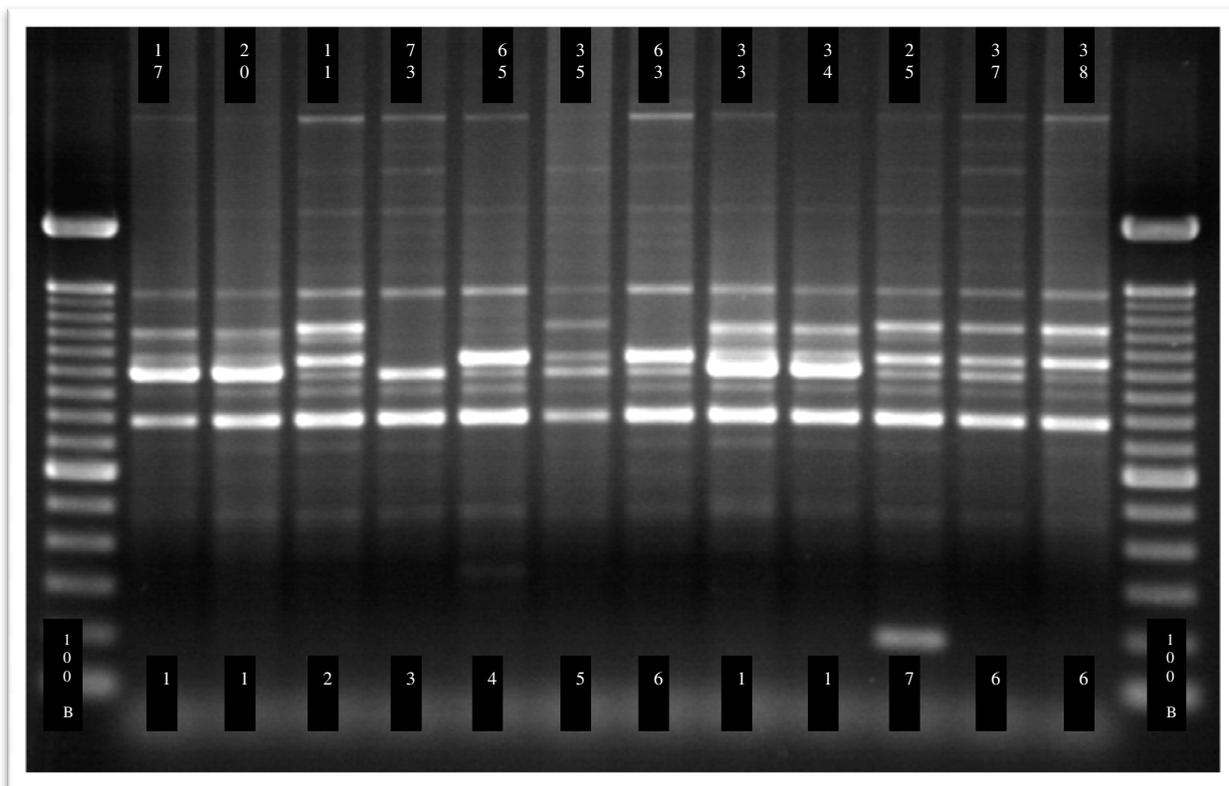
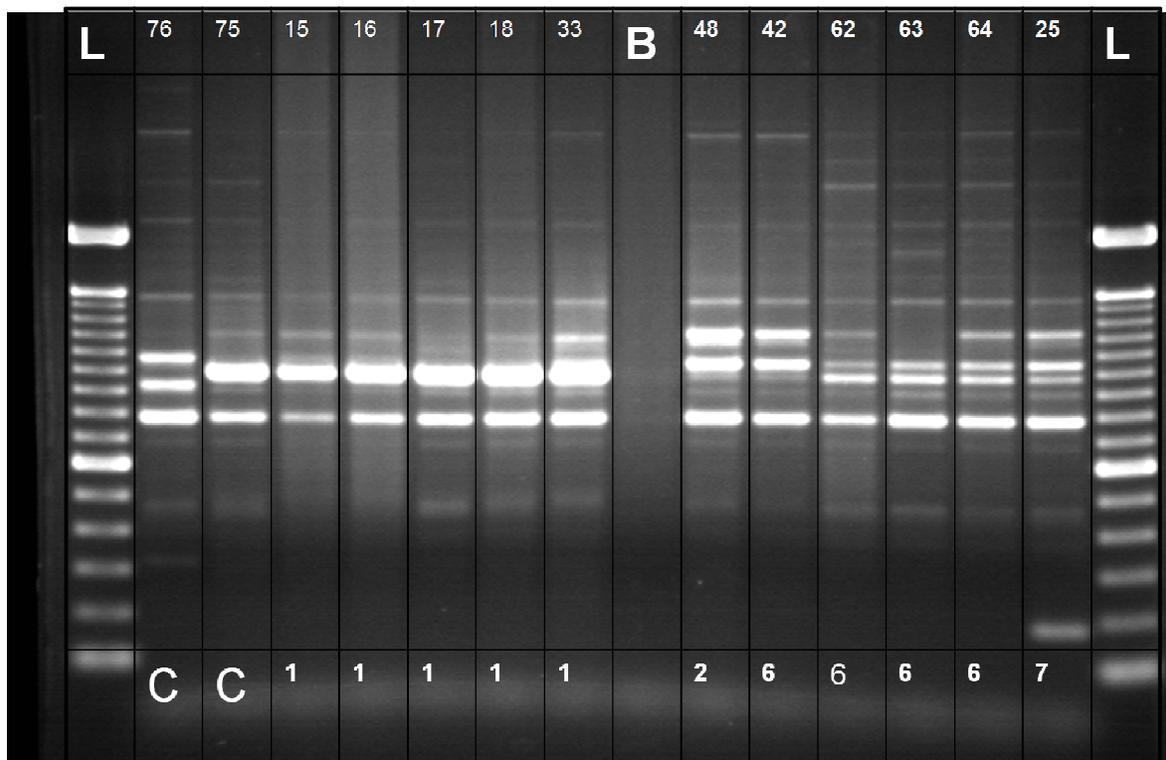


Figura 5. ERIC-PCR – confirmação dos resultados.

Confirmação dos resultados utilizando o método ERIC-PCR.



Confirmação dos resultados utilizando o método AP-PCR (RW3A).

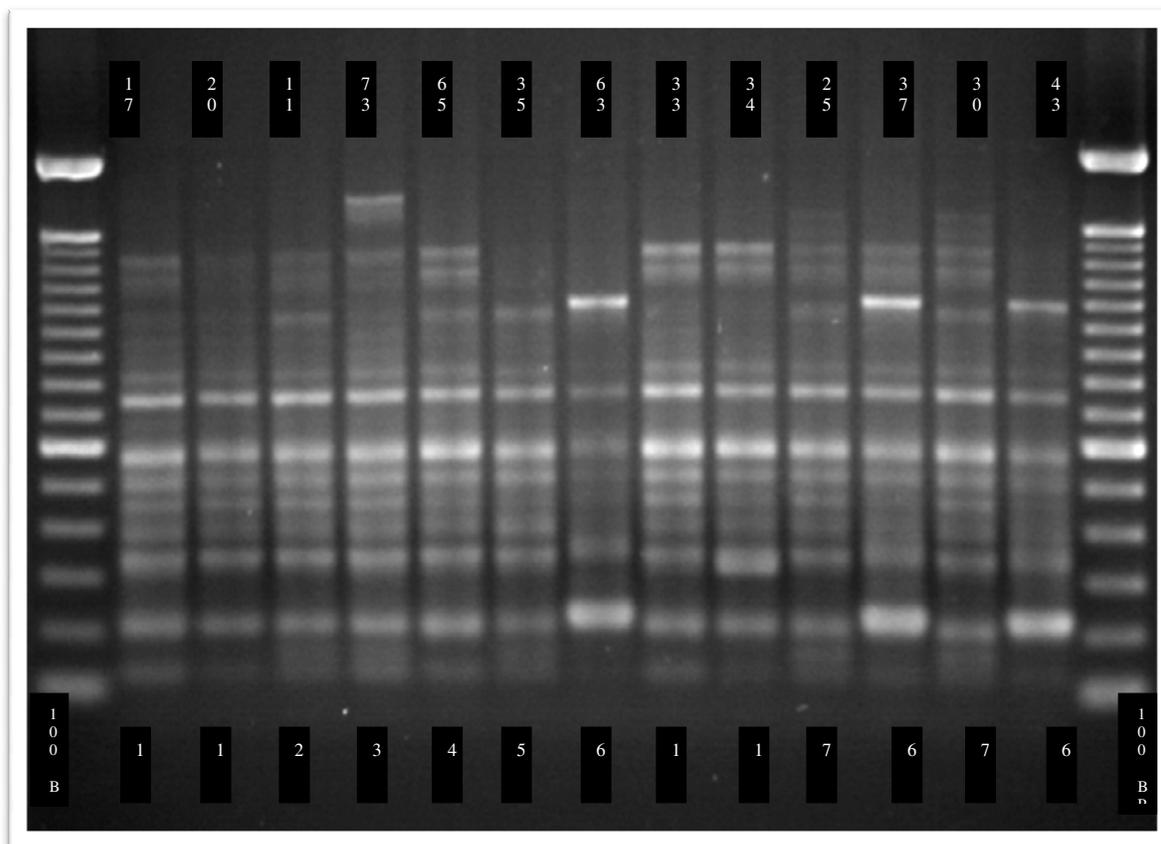


Figura 7. AP-PCR – confirmação dos resultados.

O método RW3A comprova que a amostra 63 pertence ao genótipo 6. As bandas superiores da amostra 63 são bem claras, mas elas estão presentes pois foram visualizadas no gel anterior. O método RW3A também comprova que os genótipos 3, 6 e 7 são distintos apesar do elevado grau de similaridade verificados através do método ERIC.

APÊNDICE VI – Estudo piloto de cepas *E. faecalis* controle utilizando os métodos moleculares

Teste de reproducibilidade para determinação da porcentagem similaridade utilizada.

