



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Lipopolissacarídeos em infecções endodônticas: Revisão de literatura.

Staline Jonas De Sousa Fatuda

Piracicaba

2013

Staline Jonas De Sousa Fatuda

**“Lipopolissacarídeos em infecções endodônticas:
Revisão de literatura.”**

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do diploma de cirurgião dentista.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo De Almeida
Gomes

Co-Orientador: Daniel Rodrigo Herrera Morante
Piracicaba

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Fatuda, Staline Jonas de Sousa, 1989-
F269L Lipopolissacarídeos nas infecções endodônticas:
revisão de literatura / Staline Jonas de Sousa Fatuda. --
Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida
Gomes.

Coorientador: Daniel Rodrigo Herrera Morante.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Preparo de canal radicular. 3.
Endotoxinas. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de
Almeida, 1961- II. Herrera, Daniel Rodrigo, 1976- III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Dedico este trabalho a minha
mãe Januária Sousa, que
sempre acreditou em mim.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais que possibilitaram eu realizar o meu sonho de me formar como cirurgião-dentista.

Agradeço aos meus irmãos e familiares que estiveram sempre do meu lado e acreditando em mim.

Agradeço muito à Professora Brenda Paula Figueiredo De Almeida que me orientou nesse trabalho, e que me proporcionou grande oportunidade de aprendizagem.

Agradeço muito ao meu co-orientador Daniel Rodrigo Herrera cuja ajuda foi imprescindível para o êxito desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos que, mesmo não estando presentes sempre estiveram me dando força para continuar.

Agradeço as famílias Micaroni, Tavares e Campana que me acolheram nesses anos e fizeram sentir em casa.

Agradeço a todos os integrantes das republicas em que morei, nomeadamente a Rep. CV, a Rep Fucksina. Foram minha família nesses anos de faculdade.

Agradeço ao Diogo “Gazé”, ao João “fôfô”, ao João “Job”, ao Frederico “jerê”, ao Adolfo David “paragua”, ao Arthur “Tutu” e ao Guilherme “Rex” meus colegas de republica, meus irmãos que sempre estiveram presentes nos bons e maus momentos. A nossa amizade vai para toda a vida.

Agradeço aos Bobões da t-52 em especial para o Mario Rodolpho “Nine”, o Lucas Sicca, o Bruno Vitti, o Bruno Micaroni, o Daniel Pereira e a Julia T. Campana. Bobões até o fim.

Agradeço aos meus amigos Tathiana “darthi”, Larrisa, Mabelle, Janaina “Jana”, Igor “Caborja”, Lucas Barra, Carol, Luciana “Russa”, Alexandre “Xona”, Rodrigo “minotauro”, Michele O Lima, aos “Dinossauros” e aos amigos da rep. H-romeu.

Agradeço aos meus amigos do Rep. Tidos, Juliana “Trans”, Ana Vallini, Julio “Lesma”.

Agradeço aos colegas da T-54, eles me acolheram na turma e lá fiz muitas amizades.

Agradeço por fim e não menos Importante à FOP-UNICAMP e ao corpo docente pelo aprendizado como aluno e como pessoa.

RESUMO

O LPS presente na membrana das bactérias Gram-negativas é um fator determinante de virulência nas espécies patogênicas. Este LPS estimula o sistema imunológico do hospedeiro na produção de mediadores químicos da inflamação, o que resulta em sintomatologia clínica e destruição. O conhecimento do mecanismo de ação e os métodos terapêuticos para conseguir reduzir os níveis de endotoxinas para que nossos tratamentos endodônticos sejam mais previsíveis. Assim, esta revisão de literatura teve por objetivo fazer um levantamento bibliográfico sobre o papel do LPS nas infecções endodônticas e a terapêutica utilizada na sua redução.

Palavras chave: Endodontia. Preparo de canal radicular. Endotoxinas.

ABSTRACT

LPS present in the membrane of Gram-negative bacteria is a determinant of virulence in pathogenic species. This LPS stimulates the host-immune system in the production of chemical mediators of inflammation, resulting in clinical symptoms and bone destruction. The knowledge of the mechanism of action and therapeutics to achieve lower levels of endotoxin will do our endodontic treatments more predictable. Thus, this literature review aimed to review the evidence about the role of LPS in endodontic infections and recent therapeutic used in its reduction.

Keywords: Endodontics. Chemomechanical preparation. Endotoxins.

1. INTRODUÇÃO

O LPS é um fator determinante de virulência nas espécies patogênicas. Conhecido também como endotoxinas, são moléculas que se encontram na superfície da membrana das bactérias Gram-negativas, e são secretadas durante a fase de crescimento bacteriano ou liberadas durante a morte delas (Rietschel et al., 1992).

O LPS representa a principal superfície antigênica, apresentando significância microbiológica e imunológica. Bactérias Gram-negativas presentes na cavidade oral são capazes de produzir LPS e estimular o sistema imunológico do hospedeiro para liberar mediadores químicos da inflamação (Rietschel & Brade 1992, Santos et al., 2000).

Nos canais radiculares as bactérias Gram-negativas também têm um papel importante na destruição óssea periapical e na perpetuação das lesões periapicais (Martinho e Gomes, 2008; Martinho et al., 2011).

Assim esta revisão de literatura teve por objetivo fazer um levantamento bibliográfico sobre o papel do LPS nas infecções endodônticas.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Mecanismo de ação do LPS

O LPS são moléculas presentes na superfície da membrana das bactérias Gram-negativas, as quais são secretadas em vesículas durante a fase de crescimento bacteriano ou liberadas durante a morte celular (Rietschel et al., 1992). Muitas espécies bacterianas possuem formas ou arquiteturas constituídas de componentes específicos como uma porção medial- lípide A, uma porção distal- Antígeno O, e um núcleo- chamado de “core”. (Luderitz et al., 1981, Rietschel et al., 1992). O antígeno O é a cadeia mais longa e a porção mais variável da molécula entre espécies bacterianas e responsável por induzir uma resposta imunológica específica por meio da produção de anticorpos específicos. O core tem constituição pouco variável mas também pode induzir a formação de anticorpos específicos. O core é constituído de uma parte de açúcares e uma parte chamada KDO (2-keto-3-deoxioctano), que se liga ao lípide A interferindo na sua bioatividade (Rietschel et al., 1992). O Lípide A é a porção efetivamente tóxica de toda a molécula, cause que causa respostas imunológicas específicas. É a porção menos variável do LPS entre as espécies bacterianas e esta constituída de duas moléculas de açúcares (glicosamina) modificada por fosfato (PO_4) e um número variável de cadeias de ácidos graxos e 14 átomos de carbono (Rietschel et al., 1992).

O efeito tóxico do LPS depende diretamente da resposta inata do hospedeiro (Rietschel & Brade 1992, Santos et al., 2000), podendo interagir com vários sistemas celulares e humorais, com quadros febris (ação no hipotálamo), neutrofilia (ação na medula óssea), proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), liberação de aminoácidos a nível dos músculos, produção de interleucina-2 (ação nas células T) e a produção de anticorpos (ação nas células B).

O LPS induze às células de defesa do hospedeiro na produção de mediadores químicos, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL) - 1, 6 e 8, lípidios e radicais livres.

2.2 LPS nas infecções endodônticas

O teste mais sensível e específico disponível para a detecção e medida de endotoxina provenientes das bactérias gram-negativas é *Limulus ameobocyte lysate* (LAL) (Novitsky, 1994). Este tem sido utilizado para quantificar pequenas concentrações de endotoxinas em canais radiculares infectados (Jacinto et al., 2005; Vianna et al., 2007; Martinho e Gomes 2008; Martinho et al., 2011; Endo et al., 2012). Este método baseia-se na reação entre a endotoxina e um componente protéico do LAL que produz um gel opaco de fácil reconhecimento. A formação do gel indica a presença de endotoxina na amostra e em uma quantidade igual ou superior à sensibilidade do LAL utilizado. O teste utiliza um corante sintético que permite a detecção e quantificação de endotoxinas cromogenicamente através do leitor de Elisa.

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

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

Khabbaz et al. (2000) investigaram a presença ou ausência de endotoxina, quantificaram endotoxina e associaram a presença de endotoxina com dor aguda de origem pulpar em 24 amostras coletadas da superfície da lesão cariosa em 9 molares e 15 pré-molares com pulpite irreversível e reversível. Os dentes foram divididos em 3 grupos: sintomáticos com presença de lesão cariosa (n=9), assintomáticos com presença de lesão cariosa (n=11) e grupo controle sem cárie. Os resultados indicaram a presença de endotoxina em valores mais elevados nos casos sintomáticos, quando comparado aos casos assintomáticos. Os dentes do grupo controle estavam livres da presença de endotoxina.

Laghios et al. (2000) realizaram estudo in vitro com o objetivo de estabelecer evidências de infiltração apical por LPS de um patógeno bucal (*Porphyromonas gingivalis*). Os autores concluíram que dentes obturados com guta-percha podem permitir a infiltração por LPS de patógenos orais.

Jacinto et al. (2005) investigaram a concentração de endotoxina em dentes com polpa necrosada e avaliaram possível relação entre a concentração de endotoxina e a presença ou ausência de sinais e sintomas. As amostras foram coletadas de 50 canais radiculares em dentes com necrose pulpar. A quantidade de endotoxina foi mensurada através do teste LAL. Foram encontradas associações positivas entre a concentração de endotoxina e a presença de sintomatologia.

Schein & Schilder (2006) quantificaram endotoxina através do LAL de amostras coletadas em canais radiculares de 40 dentes, dos quais foram divididos clinicamente nos seguintes grupos: dentes vitais e assintomáticos (n=10), dentes vitais e sintomáticos (n=10), dentes despulpados e assintomáticos (n=10) e dentes despulpados e sintomáticos (n=10); e radiograficamente: dentes com presença de lesão periapical (n=23) e ausência de lesão periapical (n=17). Os dentes com sintomatologia clínica e presença de lesão periapical apresentaram maior concentração de endotoxina.

2.3 Efetividade do PQM e da MIC na redução de LPS

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

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

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

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

Vianna et al. (2007) quantificou a presença de endotoxina em 24 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical antes (C1) e após a instrumentação com clorexidina gel 2% (C2), após soro fisiológico (C3), após o uso das medicações hidróxido de cálcio, clorexidina gel e sua associação (C4). Endotoxinas foram detectadas em 100% das coletas iniciais. Após PQM houve uma redução de 44,4% quando comparada à C1. C3 mostrou unicamente uma redução de 1,4% quando comparada a C2.

Martinho e Gomes (2008), avaliaram a presença de LPS em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, assim como o efeito do PQM com NaOCl 2,5% na redução desses níveis. Os resultados mostraram presença de endotoxinas nos 24 canais avaliados. Após o PQM houve uma redução de 59,99% dos níveis de endotoxinas e uma redução de 99,78 da carga microbiana. Os autores concluíram que o PQM com NaOCl é efetivo na redução da carga microbiana mas moderadamente efetivo na redução dos níveis de endotoxinas.

Gomes et al. (2009) compararam a eficácia do NaOCl 2,5% e da CHX em gel 2% na redução dos níveis de endotoxinas presentes em canais radiculares de dentes com infecção primária. Os resultados mostraram a presença de endotoxinas nas amostras iniciais dos 54 canais analisados. Embora o PQM diminuiu significativamente os níveis de endotoxinas, nem

NaOCl 2,5% nem CHX 2% conseguem eliminar completamente as endotoxinas.

Martinho et al. (2010) avaliaram a capacidade do PQM com instrumentos rotatórios de Ni-Ti, NaOCl 2,5% e EDTA 17% na redução de endotoxinas presentes em canais radiculares com infecção primária e lesão periapical. Presença de endotoxinas foi detectada em todas as amostras iniciais avaliadas, porém após o PQM houve uma redução de 98,06 %. Os autores concluíram que o PQM com instrumentos rotatórios de Ni-Ti, NaOCl 2,5% e EDTA 17% promove a redução de endotoxinas.

Endo et al. (2012) avaliaram a presença de endotoxinas em casos de fracasso do tratamento endodôntico. Foram avaliados 15 dentes com periodontite apical e que tinham sido submetido a tratamento endodôntico previamente. Houve presença de endotoxinas em todos os casos avaliados e os níveis maiores estiveram diretamente relacionados ao tamanho da lesão periapical, porém o PQM foi capaz de reduzir significativamente estes níveis de endotoxinas.

Frente a presença de endotoxinas tanto em infecções primárias como em casos de fracasso do tratamento endodôntico, Gomes et al., em 2008 compararam clinicamente estes níveis. Foram avaliados 15 casos de infecção primária e 15 casos de fracasso do tratamento endodôntico. Foi encontrada uma relação direta entre o tamanho da lesão periapical e os níveis de LPS. Os níveis de LPS foram maiores nos casos de infecção primária. Os autores explicam este resultado devido à presença de comunidades de bactérias Gram-negativas quando comparado com infecções secundárias.

Xavier et al., (2013) avaliaram a influencia da MIC na redução de endotoxinas presentes em infecções primárias. Foram detectadas endotoxinas nos 48 canais avaliados, estes foram submetidos a diferentes protocolos de irrigação, os quais conseguiram diminuir os níveis de endotoxinas, porém nenhum deles conseguiu eliminar completamente o LPS bacteriano. A utilização de MIC por 7 dias se mostrou mas efetiva na redução de endotoxinas quando comparada aos casos tratados em sessão única.

3. CONCLUSÃO

Independentemente do protocolo de instrumentação ou da SQA utilizada durante o PQM, remanescentes de endotoxinas podem ser encontrados nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica. Protocolos que incluíam ativação das SQA, assim como a renovação constante das mesmas podem garantir esta redução para níveis significantes.

As endotoxinas são potentes estimuladores do sistema imunológico do hospedeiro na produção de mediadores químicos da inflamação.

São necessárias pesquisas que visem avaliar a real relação entre o remanescente endotóxico e a perpetuação da infecção periapical.

REFERÊNCIAS

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins – An integral part of many bacteria, these molecules are at once brutal and beneficial to humans. Efforts are under way to block the bad effects and harness the good. *Scient Am.* 1992; 32: 26-33.
2. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scient Am.* 1992; 267: 54-61.
3. Santos et al. 2000, Copyright© Medicina on line – Revista Virtual de medicina. V. 1, n. 6, Ano I, Out / Nov / Dez, 2000 medonline.com.br/med_ed/med8/edotox.htm.
4. Siqueira JF Jr. Treatment of endodontic infections. London: Quintessence Publishing; 2011.
5. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277–88.
6. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291–301. e3.
7. Trope M, Debelian G. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford T, eds. *Essential endodontology*. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard Ltd; 2008:347–80.
8. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119–25.
9. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000;26:751–5.
10. Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod* 2007;33:667–72.
11. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002;35:13–21.
12. Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rocas IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod* 2007;33:800–5.

13. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999;32:361–9.
14. Rocas IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 2008;46:3599–606.
15. Siqueira JF Jr, Rocas IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res* 2009; 88:61–5.
16. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002;40:1001–9.
17. Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008;34:926–31.
18. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35–40.
19. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 2006;39:484–92.
20. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:122–30.
21. Huffaker SK, Safavi K, Spangberg LS, Kaufman B. Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. *J Endod* 2010;36:1315–8.
22. Rogers GB, Stressmann FA, Koller G, Daniels T, Carroll MP, Bruce KD. Assessing the diagnostic importance of nonviable bacterial cells in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:133–41.
23. Rocas IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod* 2010;36:45–52.
24. McCarty SC, Atlas RM. Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine. *PCR Methods Appl* 1993;3:181–5.
25. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:19–23.
26. Chavez de Paz LE, Molander A, Dahlen G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 2004;37:579–87.
27. Chavez de Paz L. Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004;9:79–96.