



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

***EFICÁCIA DO PREPARO BIOMECÂNICO NA ELIMINAÇÃO DE
UM GRUPO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOTA ENDODÔNTICO***

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de mestre em Medicina Dentária*

Por:

Cátia Sofia Ferreira Reis

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

***EFICÁCIA DO PREPARO BIOMECÂNICO NA ELIMINAÇÃO DE
BACTÉRIAS DO MICROBIOTA ENDODÔNTICO***

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de mestre em Medicina Dentária*

Por:

Cátia Sofia Ferreira Reis

Viseu, Setembro 2011



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

***EFICÁCIA DO PREPARO BIOMECÂNICO NA ELIMINAÇÃO DE
UM GRUPO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOTA ENDODÔNTICO***

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de mestre em Medicina Dentária*

Orientador: Professor Doutor Manuel da Fonseca Paulo

Co-orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Por:

Cátia Sofia Ferreira Reis

Viseu, Setembro 2011

I have had several gentlewomen in my house, who were keen on seeing the little eels in vinegar: but some of them were so disgusted at the spectacle, that they vowed they would never use vinegar again. But what if one should tell such people in the future that there are more animals living in the scum on the teeth in a man's mouth, than there are men in a whole kingdom?

Antonie van Leeuwenhoek, 1674

Agradecimentos

A realização deste trabalho de investigação resultou também do incentivo e colaboração de várias pessoas que contribuíram directa ou indirectamente para a sua concretização. Quero deste modo expressar o meu agradecimento.

Ao Professor Doutor Jorge Leitão, Coordenador do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, pelo exemplo de competência e transmissão de conhecimentos científicos.

Ao meu Orientador, Professor Doutor Manuel Paulo, e Co-orientadora, Professora Doutora Maria José Correia, pelo exemplo de competência, dedicação profissional, disponibilidade, orientação e incentivo neste trabalho.

À Universidade Católica Portuguesa, instituição que guardarei na minha memória, agradeço aos professores e funcionários.

Aos meus estimados amigos, colegas e ex-alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, pela amizade e companheirismo.

À minha binómia e companheira de box, Raquel Barbosa, pela amizade, apoio e compreensão durante todo este percurso académico.

À minha colega, Marta Nobre, pela paciência, apoio e amizade ao longo deste trabalho.

À minha amiga de sempre e para sempre, Mariana Cunha, pelos momentos partilhados e apoio incondicional.

Ao Dr. João de Barros, pelo incentivo, partilha de conhecimentos e por todo o carinho.

A todos os meus familiares por todos os momentos já vividos, principalmente à minha mãe, irmão e avós, pelo amor e confiança.

Índice de Abreviaturas

ADN - ácido desoxirribonucleico

DNA - deoxyribonucleic acid

PCR - reacção em cadeia de polimerase

PCR - Polymerase Chain Reaction

ARN - ácido ribonucleico

RNA – Ribonucleic acid

Min -minutos

C° - graus centígrados

MM-marcador molecular

TE-Tri-EDTA

TAE - Tri-Acetato-EDTA

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

EDTA - ácido etilenodiamin tetra-acético

UCP- Universidade Católica Portuguesa

PMCC - Paramonoclorofenol canforado

NaOCl – Hipoclorito de sódio

Resumo

O presente estudo teve como objectivo a identificação de um grupo de seis bactérias em amostras recolhidas de tecido humano pulpar em estado de infecção e avaliar a eficácia do preparo biomecânico na eliminação destes microrganismos. A presença dos microrganismos foi detectada usando a Polymerase Chain Reaction (PCR). Foram recolhidas amostras de 9 dentes, após a abertura da câmara pulpar (F1) e após o preparo biomecânico (F2). A irrigação foi realizada com Hipoclorito de sódio numa concentração de 0,5% – soluto de Dakin. A colheita das amostras foi realizada com limas K (F1) e com cones de papel absorventes (F2). Para a técnica de PCR, foi extraído o DNA das amostras e utilizados primers para seis microrganismos (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Em F1, três espécies investigadas estavam presentes em 100% das amostras, *Porphyromonas gingivalis*, a *Porphyromonas endodontalis* e a *Enterococcus faecalis*. Por outro lado, três espécies não foram detectadas em nenhuma das amostras, neste grupo: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Em F2, uma espécie analisada esteve presente em 100% das amostras: *Enterococcus faecalis*. A espécie *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* não foram, novamente, detectadas em nenhuma das amostras. Houve uma alteração do microbiota entre as duas fases estudadas. O procedimento foi eficaz na remoção de *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. No entanto, a técnica não foi eficaz na remoção de *Enterococcus faecalis*, que permaneceu em todas as amostras, mesmo após o preparo biomecânico.

Palavras-chave: Endodontia, microbiota endodôntico, PCR

Abstract

The aim of the study was to identify a group of six bacteria using samples of pulp human tissue, on infection state, and to evaluate the efficacy of biomechanical preparation in the elimination of these microorganisms. The presence of microorganisms was detected using the polymerase chain reaction (PCR). Samples were taken 9 teeth, after opening the pulp chamber (F1) and after biomechanical preparation (F2). Irrigation was performed with sodium Hypochlorite at a concentration of 0.5% - Dakin's solution. The sampling was performed with K files (F1) and with absorbent paper cones (F2). For PCR, DNA was extracted from samples and primers were used for six microorganisms (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). In F1, three species investigated were present in 100% of the samples, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Enterococcus faecalis*. On the other hand, three species were not detected in any sample in this group: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. In F2, a species analyzed was present in 100% of the samples: *Enterococcus faecalis*. The species *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* weren't detected in any sample, again. There was a change in the microbiota between the two phases studied. The procedure was effective in removing *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis*. However, the technique wasn't effective in removing *Enterococcus faecalis*, which remained in all samples, even after biomechanical preparation.

Key-words: Endodontics, endodontic microbiota, PCR

Índice

1. Introdução	3
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1. Infecção endodôntica	7
2.1.1. Diagnóstico	7
2.1.2. Terapia mecânica	8
2.1.3. Terapia química	8
2.1.2. Insucessos	11
2.2. Microbiologia Oral e do canal radicular	12
2.2.1. Invasão dos túbulos dentinários	13
2.2.2. Infecção nos túbulos dentinários.....	14
2.2.3. Selecção ambiental no canal radicular	15
2.2.4. Relações entre bactérias.....	16
2.2.5. Diagnóstico microbiológico.....	16
3. Objectivos	31
4. Materiais e Métodos.....	35
4.1. Amostra.....	35
4.2. Colheita das amostras	35
4.3. Protocolo de colheita	35
4.4. Protocolo de extracção de ADN utilizado	36
4.5. Protocolo de amplificação de ADN em reacção de PCR.....	36
5. Resultados.....	41
6. Discussão	45
7. Conclusões	51
8. Bibliografia	55
9. Anexos	71
Anexo I	71
Anexo II	72
Anexo III	74
Anexo IV	77

Eficácia do preparo biomecânico na eliminação de um grupo de bactérias do microbiota endodôntico

Introdução

1. Introdução

As infecções endodônticas são provocadas pela invasão microbiana dos tecidos pulpaes íntegros ou dos tecidos periapicais. Estas infecções são de carácter polimicrobiano, com predominância de bactérias anaeróbias.

O objectivo do tratamento endodôntico é manter, ou restabelecer, a saúde dos tecidos periapicais, pela tentativa de manter o canal radicular livre de infecção. Os passos do tratamento endodôntico responsáveis pelo controlo antimicrobiano são o preparo biomecânico e a medicação mediata intracanal. O preparo biomecânico é a fase do tratamento endodôntico, na qual se realiza a instrumentação e irrigação dos canais, com o objectivo de os tornar aptos para a obturação. Tanto o preparo biomecânico, como a terapia mediata, são efectivos no controlo da infecção do canal radicular, no entanto, bactérias mais resistentes podem sobreviver a estes procedimentos e conduzir o tratamento ao insucesso.

A maioria de estudos que analisam o efeito antimicrobiano dos procedimentos endodônticos são baseados em métodos dependentes de cultura. Estes métodos apresentam baixa sensibilidade, detectando apenas bactérias viáveis em cultura excluindo filótipos não cultiváveis. Acresce ainda que a viabilidade das bactérias normalmente colonizadoras da câmara pulpar muitas vezes não se mantém durante o processo de colheita pois algumas destas espécies são anaeróbios obrigatórios e durante o processo de colheita, ainda que por breves segundos ficam expostas a Oxigénio perdendo a capacidade de crescer e multiplicar-se em cultura. Os métodos moleculares são mais sensíveis, não requerem a presença de células viáveis, uma vez que detectam a presença de DNA bacteriano. Desta forma, não são influenciados pela perda de viabilidade dos microrganismos durante o transporte das amostras.

No entanto, os métodos moleculares também apresentam as suas limitações. A sua capacidade para detectar DNA de células bacterianas não viáveis, pode colocar um problema ao estudo do efeito antimicrobiano imediato de um dado procedimento, uma vez que o DNA libertado pelas células recentemente mortas ainda consegue ser detectado.

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Infecção endodôntica

As bactérias, provenientes das lesões de cárie ou dos tecidos periodontais, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da infecção endodôntica (1,2). O objectivo do tratamento endodôntico é eliminar as bactérias do sistema canalár, e desta forma propiciar um ambiente favorável ao tratamento de lesões periapicais. A persistência dos microrganismos no canal radicular exerce um papel determinante nos insucessos do tratamento endodôntico (3).

2.1.1. Diagnóstico

O envolvimento pulpar inicial é essencialmente reconhecido através dos sintomas clínicos ou através da exploração da dentina contaminada. As técnicas radiográficas podem sugerir a proximidade ou contacto de uma lesão cariosa com o tecido pulpar, mas não confirmam um diagnóstico definitivo (4,5).

O diagnóstico pulpar deve ser baseado na experiência do operador, no conhecimento do processo biológico da infecção endodôntica e na história clínica do paciente (5). Estudos tentaram estabelecer uma relação entre características clínicas, histológicas e bacterianas com a inflamação pulpar, mas com pouco êxito (6).

Pulpite reversível é o termo aplicado a um estado de inflamação aguda dos tecidos pulpares, em que a desinflamação é possível, mediante tratamento adequado. Os sintomas associados a este estado são dor moderada a severa, a estímulos, por norma térmicos, nomeadamente ao frio. A resposta à percussão e palpação dos tecidos moles adjacentes é ausente. A dor dura apenas alguns segundos após o estímulo. A aparência radiográfica é normal (7).

No estado de pulpite irreversível, a polpa encontra-se severamente inflamada, em estado crónico e sem possibilidade de desinflamação. Se neste estado, o dente não for tratado mediante terapia endodôntica, a polpa evoluirá para necrose, e posteriormente, para periodontite periapical. Pode haver sintomatologia dolorosa, moderada a severa, ou sensibilidade, que dura para além do estímulo.

Radiograficamente podem observar-se alterações, nomeadamente lesão de cárie ou restauração inadequada (7).

O estado de morte das células do tecido pulpar designa-se necrose pulpar. Normalmente, é sequência de pulpíte irreversível não tratada ou de um evento traumático. Neste estado, os canais radiculares encontram-se vulneráveis à invasão bacteriana. Sem tratamento, origina peridontite apical. A dor pode, ou não, estar presente. Verifica-se a ausência de resposta face a testes de vitalidade térmicos, no entanto, outros dados devem ser analisados para diagnóstico definitivo (7).

2.1.2. Terapia mecânica

Na Endodontia moderna, parte da capacidade de desinfecção do canal radicular, cabe à instrumentação mecânica, removendo os microrganismos, juntamente com o seu substracto (8).

Siqueira et al, avaliaram a eficácia da instrumentação mecânica sobre a população microbiana dos canais radiculares. Os canais foram instrumentados com limas Nitiflex, GT e Profile 0,06, após contaminação *in vitro* com *E. faecalis*. Os autores concluíram que as técnicas utilizadas foram eficazes na redução de mais de 90% do número de microrganismos (9).

2.1.3. Terapia química

A instrumentação endodôntica não é suficiente, por si só, para a descontaminação bacteriana. Existem áreas dentro dos canais radiculares de grande complexidade anatómica e os instrumentos só conseguem atingir o canal principal. Por este motivo, é importante a utilização de uma substância química auxiliar à acção mecânica. A substância química tem como funções auxiliar na lubrificação canalar, durante o corte provocado pelos instrumentos; remoção da *smear layer*; desinfecção; dissolução do exsudado e dissolução do tecido pulpar necrótico (10,11).

2.1.3.1. Terapia imediata

Walker (1936) introduziu o Hipoclorito de sódio (NaOCl), na concentração de 5%, na terapia endodôntica como substância química auxiliar. Iniciou-se, assim, uma fase onde essa solução seria reconhecida e aceita a nível mundial (12).

O NaOCl apresenta acção antimicrobiana (13)(14) e capacidade de dissolução tecidual (15). Vários estudos concluíram que o NaOCl apresentou acção antibacteriana face aos microrganismos encontrados nos canais radiculares (10,16–18).

O hipoclorito de sódio, em forma de sal, reage com a molécula de água, formando hidróxido de sódio, uma base forte, e ácido hipocloroso, um ácido fraco. O hidróxido de sódio é um solvente orgânico e de gorduras (reacção de saponificação). O ácido hipocloroso liberta cloro, que se liga aos aminoácidos bacterianos e interfere com o metabolismo celular. Por outro lado, inibe a função enzimática das bactérias, através de oxidação irreversível dos grupos sulfidríla (19–21).

Alguns estudos relataram injeções acidentais desta substância nos tecidos periapicais, e alertaram para o cuidado na sua utilização. Estes casos acidentais podem provocar dor severa, edema, hematoma, necrose e abscessos (22,23). No entanto, a toxicidade do Hipoclorito de sódio está intimamente relacionada com a sua concentração (22,24,25).

Face à possível toxicidade do Hipoclorito de sódio, a Clorohexidina tem sido recomendada como substância irrigadora alternativa. Esta substância é biocompatível e pode ser apresentada sob diferentes formas (sal, líquido ou gel), em diferentes concentrações (13,14,26,27). A Clorohexidina pode ser utilizada como irrigante adjuvante à terapia mecanizada, ou como medicação mediata intracanal (13,28–30).

A Clorohexidina possui efeito antimicrobiano imediato; espectro antibacteriano amplo, sob bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias (13,31); pouca toxicidade(32); pode ser absorvida pela dentina e libertar lentamente a sua substância activa, prolongando o efeito de acção (26,33).

Em baixas concentrações, a clorohexidina promove a saída das substâncias de baixo peso molecular (Potássio e Ferro) das células bacterianas – efeito bacteriostático. Em altas concentrações, precipita ou coagula o conteúdo citoplasmático – efeito bacteriostático (34).

Vianna et al (2006), avaliaram a redução microbiana após preparo mecânico-químico com Clorohexidina em gel a 2% ou NaOCl (2,5%). A redução foi avaliada através do método de PCR e do método tradicional de cultura, a título de comparação. Os resultados, através da técnica de PCR, demonstraram que ambos foram capazes de

reduzir significativamente (acima de 96%) a quantidade de microrganismos presentes nos canais radiculares. No entanto, pelo método de cultura, o NaOCl apresentou maior número de canais livres de microrganismos (75% dos casos, enquanto a clorhexidina conseguiu 50% de canais livres). Deste modo, os autores concluíram que o hipoclorito apresentou maior eficácia na redução microbiana de canais radiculares com infecção primária (35). De forma semelhante, Ercan et al (2004), consideraram que ambas as soluções, clorhexidina (2%) e hipoclorito de sódio (5,25%), foram eficazes na redução microbiana de canais radiculares. Deste modo, ambas podem ser utilizadas como soluções irrigadoras (36). Bystrom & Sundqvist (1983), avaliaram o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 0,5% sobre dentes com coroa intacta, diagnóstico de necrose pulpar e presença de lesão periapical. A maioria das culturas tinha mais do que uma espécie e os gêneros mais frequentes foram *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides*. Os autores observaram que 12 das 15 culturas correspondentes à irrigação com hipoclorito, estavam negativas. Como termo de comparação, foram recolhidas amostras de dentes irrigados com soro fisiológico. Neste caso, apenas 8 das 15 culturas ficaram negativas. Desta forma, concluiu-se que o hipoclorito de sódio foi mais efectivo, em relação ao soro fisiológico (10). Para terminar, Shuping et al (2000), avaliaram a redução microbiana após instrumentação com limas NiTi e irrigação com hipoclorito a 1,25%. Neste estudo, também foi avaliada a acção antimicrobiana do hidróxido de cálcio, sob o ponto de vista de terapia intracanal mediata. Os autores concluíram que a fase de instrumentação é fundamental para a redução do microbiota dos canais radiculares, quando utilizado uma substância irrigadora auxiliar. No entanto, não foi possível eliminar totalmente os microrganismos dos canais estudados. É de destacar a importância de uma terapia intracanal mediata que poderia auxiliar na redução da contaminação endodôntica (37).

2.1.3.2 Terapia mediata

Têm sido utilizadas várias substâncias microbianas como medicação intracanal, com o intuito de reduzir a contaminação bacteriana ou neutralizar as toxinas. São exemplos de medicação intracanal o Formocresol (38), Clorhexidina (39,40), Hipoclorito de sódio (41,42), Hidróxido de cálcio (39,39–41) e Paramonoclorofenol canforado (PMCC) (43).

Bystrom et al (1985), avaliaram clinicamente a acção antimicrobiana do PMCC e pasta de Hidróxido de cálcio em canais com diagnóstico de necrose e presença de lesão periapical. Concluíram que o Hidróxido de cálcio foi eficaz em 97% dos casos, enquanto o PMCC apresentou um índice de sucesso de apenas 67% (11).

Por outro lado, Barbosa et al (1997), estudaram a actividade antimicrobiana do Paramonoclorofenol canforado, Clorohexidina 0,12% e 0,2% e pasta de Hidróxido de cálcio em dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Os resultados demonstraram que todos os medicamentos foram efectivos na redução ou eliminação do microbiota endodôntico. Foram testadas bactérias frequentes nas infecções endodônticas (*P.endodontalis*, *P.gingivalis*, *A.israeli*, *F.nucleatum*, *P.acnes*, *S.aureus*, *S.mutans*, *E.faecalis* e *P. Aeruginosa A.naeshlundii*). O paramonoclorofenol e a clorohexidina, foram igualmente efectivos sobre todos os microrganismos. O hidróxido de cálcio foi apenas eficaz sobre *A.israeli* e *A.naeshlundii* (44).

Em 2010, Telles avaliou o efeito citotóxico do Hidróxido de cálcio, PMCC, Otosporin e Formocresol diluídos, em células da polpa de dentes permanentes humanos. Os autores concluíram que o Hidróxido de cálcio e o Otosporin foram os medicamentos menos tóxicos para as células, enquanto que o PMCC e o Formocresol foram letais em todas as concentrações (45). Nagem et al (2007), concordaram com a toxicidade do PMCC, no entanto a toxicidade depende da sua concentração (46).

Nishimura et al (2008), afirmaram que o Formocresol gerou aberrações cromossómicas em células da polpa dentária, no entanto o mesmo não aconteceu para o Hidróxido de cálcio e PMCC (47).

2.1.2. Insucessos

Estudos demonstraram que o tratamento endodôntico apresenta uma elevada taxa de sucesso. Sjogren (1990) apresentou uma taxa de 96% em dentes sem lesão apical e uma taxa de 86% naqueles com lesão apical, ou diagnóstico de necrose (48). Smith (1993) detectou uma taxa de sucesso de 84,29% numa avaliação de 821 casos, durante 5 anos (49). Friedman (1995) verificou uma percentagem de sucesso de 97% em casos sem lesão apical e de 63,2% nos dentes com lesão (50).

O insucesso baseia-se nos achados radiográficos e/ou sintomas clínicos. São considerados para este efeito os dentes com lesões ósseas que aumentam ou que surgem

após o tratamento. No caso de ausência de lesão ou de remissão da lesão, considera-se como sucesso (48,51).

A resistência bacteriana à terapia mecânico-química ou a contaminação através de infiltrações coronária, são as causas principais do insucesso após tratamento endodôntico (51–55).

Cheung considerou como factores que podem levar ao insucesso: falta de controlo asséptico durante o tratamento, um acesso incorrecto à cavidade pulpar, presença de canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas, restaurações coronárias insatisfatórias definitivas e presença de restaurações provisórias após tratamento endodôntico (54).

Lin (1992) analisou os factores associados ao insucesso e concluiu que a persistência de infecção no sistema canalar foi o principal factor associado ao fracasso do tratamento. Este autor, considerou que a extensão apical da obturação, sobre ou sub-obturado, não esteve associado aos casos de fracasso (52).

Além dos problemas anatómicos, que impossibilitam a instrumentação mecânica em algumas áreas do canal, o insucesso da terapia pode estar relacionado com uma resistência das bactérias aos métodos químicos adjuvantes. Desta forma, os procedimentos mecânico-químicos parecem incapazes de eliminar completamente as bactérias do sistema canalar, sendo algumas espécies mais resistentes que outras (56).

2.2. Microbiologia Oral e do canal radicular

Os microorganismos estão presentes em todos os locais, mas são seleccionados pelo seu meio ambiente. A flora oral é um dos ambientes ecológicos mais diversos associados ao homem. Contém aproximadamente 700 espécies diferentes de organismos, sendo aproximadamente 350 cultiváveis. Estima-se que a saliva contém 100 milhões de organismos por mililitro (57–59).

A cavidade oral torna-se ainda mais complexa ao providenciar superfícies ou habitats únicos, como dentes ou sulcos gengivais. De qualquer das formas, a boca é similar a outros locais do corpo na medida em que tem uma flora oral residente, com uma composição específica e elevado número de bactérias anaeróbias.

A microflora oral mantém uma relação com o hospedeiro, isto significa que poderá ser determinada por mudanças no *habitat*, como por exemplo, xerostomia ou

pacientes imunossuprimidos. Quando estas alterações se verificam, algumas bactérias que eram inofensivas podem tornar-se patogénicas, conseguindo colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro (57).

As doenças da cavidade oral, como cárie ou doença periodontal, estabelecem-se pela alteração de um biofilme já existente. As mudanças ambientais e a composição microbiana no momento em que a alteração ocorre são determinantes no desenvolvimento da doença. Como mudanças ambientais, podemos considerar um aumento de bactérias acidogénicas devido à alimentação, ou aumento de bactérias proteolíticas, no sulco gengival (57,60).

O mesmo não acontece nos canais radiculares, a infecção estabelece-se num ambiente previamente estéril, livre de microrganismos (61). O esmalte dentário protege o complexo dentino-pulpar da invasão microbiana. Normalmente, tanto o esmalte, como o cimento, estão intactos protegendo a polpa e os canais radiculares de invasão. No entanto, este espaço pode ser invadido quando há situação de cárie, trauma ou bolsas periodontais muito profundas que permitem o acesso por via apical.

Embora todas as bactérias constituintes da flora oral possam contaminar os canais radiculares, o número de espécies encontradas neste habitat varia normalmente entre 1 a 12, porque nem todas as bactérias conseguem sobreviver nas condições de anaerobiose e baixa disponibilidade de nutrientes deste meio (61,62).

2.2.1. Invasão dos túbulos dentinários

As bactérias da cavidade oral expressam adesinas, na parede celular, permitindo a adesão bacteriana às diferentes superfícies da cavidade oral. Este fenómeno é favorecido pela presença de uma matriz, com conteúdo proteico (flúidos salivares, fluido crevicular). Quando invadem a camada dentária mais externa – hidroxiapatite – as bactérias conseguem ligar-se ao colagénio não mineralizado, presente nos túbulos dentinários (63–66). Estudos experimentais sugerem que as células bacterianas também podem aderir a cimento e dentina expostos (78).

Os nutrientes presentes nos flúidos que circulam nos túbulos dentinários podem influenciar a flora bacteriana. Desta forma, pode encontrar-se uma maior quantidade de bactérias cariogénicas na camada superficial da dentina, onde os hidratos de carbono e o oxigénio estão mais disponíveis. Por outro lado, as camadas mais profundas, são

favoráveis ao crescimento de bactérias anaeróbias e mais resistentes, como *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros* (67,68).

O complexo dentino-pulpar pode inibir a invasão bacteriana, particularmente quando a polpa está vital. Nos túbulos dentinários, de um dente vital, podemos encontrar um soro rico em proteínas, como albumina e imunoglobulinas; e proteínas sanguíneas como fibrinogénio (69,69,70). Estas moléculas podem interagir com as células bacterianas impedindo a invasão radicular ou, de uma forma física, obstruir os túbulos e reduzir a permeabilidade (71). No entanto, pelo efeito de moléculas bacterianas, como os lipopolissacarídeos, e enzimas secretadas, a polpa perde a sua estrutura e função e torna-se cada vez mais susceptível à infecção. Nos túbulos dentinários de um dente não vital podemos encontrar moléculas semelhantes, que derivam do osso alveolar, ligamento periodontal e saliva (72,73).

A estrutura dentinária e a invasão bacteriana também podem estar relacionadas. O número de túbulos dentinários varia da junção amelodentinária até à polpa. A deposição de dentina resulta num túbulo mais estreito, menos permeável, e é mais acentuada na dentina superficial, e menos na dentina junto à polpa. Isto resulta em túbulos com maiores diâmetros na zona mais profunda, mais permeáveis e susceptíveis à invasão bacteriana (74,75).

2.2.2. Infecção nos túbulos dentinários

A microflora que se encontra na camada mais superficial de dente, tanto nas cáries coronárias como radiculares, consiste essencialmente em espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*.(76,77)

Diferentes profundidades de dentina são caracterizadas por diferentes microfloras, sendo que a quantidade bacteriana encontrada na camada mais superficial não é a mesma que na mais profunda (78). Na dentina adjacente à polpa podemos encontrar grande número de bactérias Gram-positivas, maioritariamente anaeróbias, como *Eubacterium*, *Propionobacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces* e *Lactobacillus*, sendo as duas últimas as mais prevalentes (79).

Da mesma forma que as bactérias podem invadir o canal radicular através dos túbulos dentinários infectados, também o contrário pode ocorrer. Isto é, bactérias presentes numa polpa dentária infectada contaminarem túbulos dentinários da raiz (80).

Por último, a contaminação pode ocorrer através de uma bolsa periodontal profunda(81). Na dentina radicular infectada podem encontrar-se maioritariamente organismos Gram-positivos (*P.micra*, *Strep. intermedius*, *A.naeslundii*), embora *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *Tannarella forsythia*, *F.nucleatum* e *Veilonella parvula*, também possam estar presentes. A dentina radicular pode comportar-se como um “refúgio” dos microrganismos periodontais face à terapia. Desta forma podem contaminar novamente as bolsas periodontais após a terapia e contribuir para a falha do tratamento (82).

2.2.3. Selecção ambiental no canal radicular

As bactérias presentes nos canais radiculares infectados representam um grupo restrito de espécies, quando comparadas com o total de espécies da cavidade oral. Existem diversos factores que podem influenciar o crescimento e colonização de bactérias nos canais radiculares, tais como a disponibilidade de nutrientes; baixas quantidades de oxigénio em polpas necróticas; interações entre bactérias. Estas condições permitem o crescimento de uma população constituída por bactérias maioritariamente anaeróbias, capazes de fermentar aminoácidos e péptidos. Durante o decurso da infecção estabelecem-se relações entre as diferentes espécies bacterianas (62). Estas relações de sinergismo são essencialmente baseadas em exigências nutricionais e seguem-se alguns exemplos associados às diferentes fases da colonização bacteriana.

Em primeiro lugar, ocorre o consumo dos hidratos de carbono presentes no soro, de forma rápida. Desta forma, bactérias, como *Eubacterium*, *B.adolescentis* e *Streptococcus*, conseguem produzir ácidos. Na segunda fase, as proteínas presentes no soro são hidrolisadas, os aminoácidos fermentados e os hidratos de carbono restantes são utilizados. O crescimento da colónia nesta fase é dominado por *B.intermedius*, *V.parvula*, *Eubacterium* e *F.nucleatum*. Por último, ocorre a dregradação progressiva de proteínas e uma extensa fermentação de aminoácidos. Nesta fase, predominam a *P.micros*, *F.nucleatum* e *Eubacteriu* (83). As espécies anaeróbias pigmentadas de negro apresentam grande capacidade de degradação de proteínas, aumentando a disponibilidade de aminoácidos no soro, que podem ser fermentados por outros microrganismos. Exemplos destas bactérias são *B.intermedius*, *P.endodontalis* e *P.gingivalis* (84,85).

2.2.4. Relações entre bactérias

O crescimento de populações mistas de bactérias depende de interações bacterianas em que o metabolismo por parte de algumas espécies fornece nutrientes essenciais a outras bactérias (86).

Por outro lado, existem espécies capazes de produzir bacteriocinas, proteínas que inibem o crescimento de outras bactérias competidoras. Isto pode contribuir para a limitada diversidade bacteriana do canal radicular. Observou-se que os bacteroides pigmentados de negro, podem inibir o crescimento de outras espécies Gram-positivas verificando-se uma relação entre a presença de *P.endodontalis* e a inibição do crescimento de *B.intermedius* (87,88).

Kolenbrander observou também fenómenos de coagregação entre espécies presentes nos canais radiculares, nomeadamente entre a *F.nucleatum* e outras espécies bacterianas presentes na cavidade oral. Por coagregação entende-se o fenómeno de reconhecimento das moléculas superficiais em duas bactérias, e posterior agregação física. Este fenómeno, favorece a troca de nutrientes entre as bactérias agregadas e ajuda na protecção em relação às adversidades do meio (89,90).

2.2.5. Diagnóstico microbiológico

2.2.5.1. Recolha de amostras

O estudo da infecção endodôntica pode ser comprometido por várias fases preliminares à análise laboratorial. Podem ocorrer erros durante a descontaminação do campo operatório, recolha da amostra, transporte para o laboratório ou durante o processamento laboratorial. A descontaminação do campo de recolha é mandatória para evitar falsos positivos durante a análise microbiológica (91). No caso de ser necessário administrar terapia antimicrobiana, a recolha de amostras deve ser realizada antes (57).

O uso de isolamento absoluto é considerado imperativo quando se recolhe uma amostra dentária-endodôntica. Para além de conferir protecção contra materiais ou instrumentos que podem ser ingeridos pelo paciente, impede a contaminação da câmara pulpar. Esta contaminação pode ocorrer através da saliva ou fluído gengival (92).

As amostras podem ser recolhidas de locais normalmente estéreis, em que todos os microrganismos isolados são importantes, por exemplo a polpa dentária, ou de habitats com flora residente, como por exemplo, sulco gengival. Uma das complicações pode ser a contaminação das amostras quando o local de recolha está em íntimo contacto com uma zona colonizada (57).

Quanto ao transporte, as amostras devem ser encaminhadas o mais rápido possível para o laboratório. Em alguns casos, bactérias e fungos podem multiplicar-se rapidamente e originar falsos positivos. Por outro lado, há microrganismos menos resistentes que podem não sobreviver o tempo do transporte e originar falsos negativos, para amostras processadas por cultivo (73).

2.2.5.2. Técnicas de análise de amostras

Tradicionalmente, as bactérias endodônticas foram estudadas por técnicas de análise de culturas, que dependem de crescimento, isolamento e identificação da morfologia microbiana, em laboratório. No entanto, os métodos de cultura e identificação tradicional têm apresentado várias limitações quando se trata de diagnóstico microbiológico, uma vez que são procedimentos demorados, não específicos e que discriminam muitas vezes a importância de determinado agente patogénico na causa da doença (93). Ultimamente podemos presenciar muitos avanços no diagnóstico por métodos moleculares, sendo de destacar a hibridização DNA-DNA, bem como a tecnologia da polimerase em cadeia (PCR) e seus derivados. De facto, os resultados dos métodos de cultura, no que diz respeito à flora de diversos ecossistemas, foram complementados com as técnicas de análise molecular verificando-se que o número de bactérias identificadas em métodos independentes de cultura é geralmente maior (94).

2.2.5.2.1. Cultura

O método de cultura caracteriza-se por um crescimento simulado de microrganismos. Esta técnica foi utilizada durante longos períodos de tempo como *standard* para diagnóstico de doenças infecciosas. A microbiota associada aos diferentes locais do corpo humano foi estudada e revista sucessivamente, por estudos baseados na cultura de bactérias. O sucesso dos métodos de cultura foi suficiente, durante muitos

anos, para justificar os diagnósticos feitos. Nessa altura, os investigadores pensavam ter descoberto a maior parte dos microrganismos existentes (95,96) .

Para simular o crescimento de uma colónia em condições laboratoriais é necessário um conhecimento vasto das condições de sobrevivência dos microrganismos. No entanto, sabe-se pouco sobre os factores que permitem a determinadas bactérias resistir em sítios específicos do corpo humano (97). Sabe-se hoje, que a maior parte dos microrganismos é difícil, ou mesmo impossível, de cultivar em laboratório. Bactérias, como *Treponema pallidum*, continuam a desafiar os investigadores neste sentido (98,99).

Quando os métodos de cultura são aplicados no diagnóstico de determinada doença de etiologia bacteriana, como meningite ou pericardite, elevado número de casos não pode ser justificado microbiologicamente (100,101).

Os métodos independentes de cultura demonstraram que 40 a 75% do microbiota humano é composto por bactérias não cultiváveis, desta forma é justo pensar que ainda existem muitos agente patogénicos desconhecidos, mesmo através de técnicas moleculares (95,102,103).

As vantagens dos métodos de cultura estão relacionadas com a possibilidade de identificar uma grande variedade de espécies numa só amostra, incluindo microrganismos que não estão a ser procurados. O cultivo de bactérias também permite determinar as susceptibilidades antimicrobianas, fisiologia e patogenia dos organismos isolados. As limitações prendem-se com o facto de ser uma técnica cara e demorada (de dias a semanas), nomeadamente quando estamos a estudar bactérias anaeróbias e muito sensíveis. Isto pode atrasar o tratamento antimicrobiano. Por outro lado, os métodos de cultura apresentam uma especificidade muito baixa, dependente da experiência do operador, assim como do modo de transporte da amostra. Por último, há a impossibilidade de cultivo de elevado número de espécies e a dificuldade de identificação de algumas espécies cultiváveis (94).

Existem diferentes razões possíveis para justificar o facto de não se conseguirem cultivar determinadas espécies, como falta de nutrientes ou factores de crescimento essenciais ao meio de cultura artificial; toxicidade do meio de cultura em si, que pode ser prejudicial ao crescimento das colónias; no caso de amostras mistas de bactérias, pode ocorrer inibição entre as espécies, através de bacteriocinas; interrupção dos sistemas de comunicação entre bactérias; Incapacidade de crescimento das colónias,

devido ao estado de baixa actividade metabólica das bactérias quando submetidas a um meio ambiental de condições diferentes – como o de cultura (96,104,105).

Apesar de determinado microrganismo ser cultivável não significa necessariamente que a sua identificação tenha sucesso (94). A observação dos microrganismos pode ser efectuada através de microscopia ou métodos imunológicos. A microscopia pode sugerir um agente etiológico para determinada patologia de carácter infeccioso, mas não apresenta a capacidade de fornecer provas definitivas em relação a uma espécie em particular. Os resultados obtidos através da observação microscópica podem ser enganosos, na medida em que determinadas espécies bacterianas podem apresentar alterações morfológicas (pleomorfismo). Por último, a microscopia apresenta uma sensibilidade e especificidade limitadas, quando queremos detectar microrganismos em amostras clínicas, uma vez que é necessário uma quantidade significativa de células microbianas (99).

Os métodos imunológicos baseiam-se numa relação de especificidade antigénio-anticorpo. Estas técnicas detectam a presença do microrganismo através de uma ligação directa, ou indirectamente por meio de uma imunoglobulina específica. O teste de ELISA e os testes de imunofluorescência directa ou indirecta, são os mais utilizados para identificação microbiana. Estes métodos apresentam várias vantagens, rapidez na identificação de espécies bacterianas; podem detectar microrganismos não viáveis (mortos); podem ser padronizados; baixo custo. Como limitações, apresentam baixa sensibilidade; podem detectar apenas a presença da espécie procurada; a especificidade depende do tipo de anticorpos utilizados na reacção; podem detectar também os microrganismos não viáveis (106,107).

2.2.5.2.1.1. Avaliação do microbiota endodôntico por meios de cultura

Estudos realizados através de meios de cultura revelaram que as infecções endodônticas são de carácter misto e que podem ser isoladas do canal entre 3 a 12 espécies (108). Na presença de abscesso agudo o número médio de espécies isoladas foi entre 2 e 8 (109,110).

Sundqvist et al (1992), concluíram que a infecção primária era dominada por bactérias anaeróbias Gram-negativas, como *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*

e *Campylobacter*. Também foram encontrados alguns Gram-positivos anaeróbios, como *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* (86).

Munson et al (2002), combinaram estudos moleculares com meio de cultura e concluíram que a primeira tecnologia revelou um microbiota endodôntico mais diversificado. Neste estudo, 40% dos microrganismos só foram detectados por técnica molecular (PCR) (111).

2.2.5.2.2. Métodos moleculares

Os organismos cultiváveis representam menos de 1% do total existente no ambiente (112). Os métodos independentes de cultura, baseados na amplificação da porção 16S do DNA, seguida por clonagem e sequenciamento, foram utilizados ultimamente para explicar a diversidade bacteriana dos diversos meios ambientais, seja no ambiente terrestre-aquático, como no próprio ser humano (102,103,113–115). Por este motivo, o número de filos bacterianos reconhecidos aumentou da estimativa original de 11 (1987) para 36 (1998), com uma estimativa actual de 52 (98,116). Os métodos moleculares têm feito uma contribuição significativa para a microbiologia médica, na identificação de agentes patogénicos, nomeadamente na cavidade oral, em que 40 a 50% das bactérias não são cultiváveis (117–119).

Existem vários métodos moleculares para o estudo microbiano, sendo a escolha dependente do trabalho laboratorial que se pretende efectuar e da resposta que se pretende obter. A técnica de PCR pode ser útil na investigação da diversidade microbiana de um determinado ambiente. O sistema de electroforese em gel com gradiente de desnaturação ou o de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição, podem analisar a estrutura de determinada comunidade microbiana. A hibridação *in situ* fluorescente permite quantificar a presença e a distribuição de determinadas espécies nos tecidos. Para estudar a presença de um microrganismo num elevado número de amostras podemos optar pela hibridação com micro e macroarrays, PCR em tempo real, PCR específico para determinadas espécies, *nested* PCR e *multiplex* PCR (94).

O primeiro estudo com aplicação de técnicas moleculares para detectar bactérias endodônticas foi o estudo de Conrads *et al* (1997), que detectou, pela primeira vez, *Tannerella forsythia* em canais radiculares infectados,

utilizando a técnica de PCR (120). Esta espécie tinha, previamente, sido detectada em canais radiculares infectados através de métodos de cultura. Estudos que se seguiram, usando a tecnologia de PCR e outras abordagens moleculares, confirmaram que *T. forsythia* é um membro comum do microbiota associado a diferentes tipos de infecções endodônticas, incluindo abscessos endodônticos (121–123).

2.2.5.2.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

A técnica de Kary Mullis (1983), veio revolucionar os procedimentos moleculares, na medida em que consegue amplificar material genético a partir de uma simples molécula (124).

Esta técnica permite a amplificação de sequências de DNA, mais de um milhão de vezes, de uma forma rápida (2 a 3 horas), repetindo de forma cíclica processos de desnaturação do DNA, *annealing* dos primers e síntese do DNA. Primers são pequenas sequências de DNA capazes de emparelhar com as 2 cadeias de DNA da secção a amplificar. O DNA que serve como modelo é submetido a altas temperaturas, para que as pontes de hidrogénio possam ser quebradas. Em sequência, há a ligação dos primers e a síntese de uma nova cadeia de DNA. As novas cadeias sintetizadas actuam como modelos para novas reacções de amplificação, nos ciclos que se seguem. Isto resulta numa amplificação exponencial de novo DNA (57,125).

O acontecimento que tornou esta técnica possível foi o isolamento de uma enzima (DNA polimerase) termo-estável, sendo a mais utilizada a Taq polimerase. A enzima, isolada de *Thermus aquaticus*, possibilita o processo e, ao permitir que a reacção de amplificação seja realizada em temperaturas elevadas (91 a 94°C), melhora significativamente a especificidade, o rendimento, a sensibilidade, e comprimento de produtos que pode ser amplificado (126).

Desde a sua introdução, foram desenvolvidas tecnologias específicas para diversas aplicações. Considera-se que a aplicação deste método no diagnóstico clínico, ao detectar a presença de microrganismos patogénicos, possa ter sido dos maiores avanços dos últimos tempos (127,128).

Existem vários métodos para analisar os resultados do PCR (visualizar os fragmentos de DNA obtidos), sendo o mais frequente a electroforese em gel de agarose. O produto resultante do PCR é carregado num gel, submetido a um gradiente eléctrico

através de uma solução tampão. O material vai migrar através do gel de acordo com o seu tamanho molecular, sendo que o material maior avança uma menor distância, pela resistência que lhe é oferecida. Simultaneamente, é corrido no gel um marcador com fragmentos de DNA de tamanho conhecido. Este marcador vai servir como padrão de tamanho molecular. Desta forma pode ser feita uma estimativa do tamanho dos produtos que estamos a analisar. Para a visualização do gel, utiliza-se uma coloração com brometo de etídio e transiluminação ultravioleta. A identidade dos produtos resultantes do PCR também pode ser confirmada através de técnicas de hibridação ou clivagem por enzimas de restrição, utilizando uma enzima específica para uma sequência do material (T-RFLP). Este último método, apresenta maior resolução que o gel (94).

Siqueira et al (2000), detectaram pela primeira vez *T.denticola* em canais radiculares infectados, através da técnica de PCR. Outros estudos moleculares, confirmaram a presença desta bactéria nas infecções endodônticas (129–131). O método de PCR também permitiu detectar *T.socranskii* num elevado número de casos de infecções endodônticas (132,133). O mesmo aconteceu com *T.maltophilum*, *T. lecithinolyticum*, *T. vincentii*, *T. Pectinovorum* e *T.amylovorum* (132,134).

2.2.5.2.2.1.1. Nested PCR

Esta técnica baseia-se na amplificação secundária de um produto previamente submetido a uma reacção de PCR. O seu objectivo é o aumento de sensibilidade. O material resultante da primeira reacção é submetido novamente a uma sequência de amplificação, permitindo detectar DNA, em porções menores do que no PCR convencional. O aumento de sensibilidade deve-se ao elevado número de ciclos a que o DNA inicial é submetido. Por outro lado, a segunda reacção é realizada com menor quantidade de DNA eucariótico (123).

Quando a amplificação de DNA não ocorre na primeira sequência de amplificação, o resultado do PCR não vai servir de modelo para a segunda reacção, uma vez que é improvável que possua regiões de DNA para os segundos primers, específicos (135).

A sua principal desvantagem é a contaminação do produto resultante da primeira reacção de PCR, durante a transferência para um tubo de reacção secundária.(94)

Estudos que utilizaram a técnica de *Nested* PCR auxiliaram na análise de microrganismos orais presentes nas infecções endodônticas. Desta forma, bactérias de

difícil cultivo ou identificação, como treponemas orais, foram adicionadas à lista de agentes patogénicos endodônticos (132).

Roças et al (2004), investigaram a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas, através do método *Nested* PCR, com o objectivo de determinar se esta espécie está associada a formas particulares de doença perirradicular. As amostras foram retiradas de dentes não tratados (infecção primária), com lesão perirradicular assintomática crónica, periodontite apical aguda ou abscesso perirradicular agudo, bem como de infecções persistentes, associadas com lesões perirradiculares assintomáticas crónicas. Esta espécie foi significativamente mais associada a casos assintomáticos do que a casos com sintomatologia. *E. faecalis* foi detectada em 20 dos 30 casos de infecções endodônticas persistentes (136).

2.2.5.2.2.1.2. Multiplex PCR

Na técnica de PCR, é frequente o estudo de uma única espécie microbiana, por meio de uma reacção individual. Esta variante do PCR pressupõe a amplificação de diferentes alvos, utilizando dois ou mais conjuntos de primers específicos, em simultâneo, numa única reacção. Desta forma, num único tubo de amostra clínica podemos detectar diferentes espécies microbianas, com uma fase única. Os estudos com multiplex PCR permitem minimizar o tempo e as despesas necessárias para a identificação bacteriana. No entanto, devem ser tomadas precauções com os primers utilizados, nomeadamente com a temperatura de annealing, que deve ser aceitável para todos (137). Além disso, a presença de muitos primers numa reacção pode levar a problemas de hibridação dos primers uns com os outros pelo que as suas sequências vem ser verificadas em conjunto.

Siqueira et al (2004), avaliaram a presença simultânea de *Dialister pneumosintes* e *F. alocis* em infecções endodônticas, através do método PCR multiplex. As amostras foram retiradas de canais radiculares infectados, associados a lesões perirradiculares assintomáticas, bem como de casos de abscessos perirradiculares agudos. *D.pneumosintes* foi detectado em 11 amostras (7 assintomáticas e 4 abscessos) e *F. alocis* foi identificado em 9 casos (6 assintomáticos e 3 abscessos). Seis amostras (3 assintomáticas e 3 abscessos) compartilhavam as duas espécies. Os dados do estudo confirmaram que *D. pneumosintes* e *F.alocis* são membros comuns da microbiota

presente em infecções endodônticas primárias. A técnica multiplex PCR foi um método simples, rápido e preciso para a detecção simultânea destes dois potenciais patógenos endodônticos (138).

2.2.5.2.2.1.3. Real-Time PCR

A técnica de PCR convencional é apenas qualitativa, e semi-quantitativa, em alguns casos. O PCR em tempo real é o único método quantitativo, através de uma medição contínua durante toda a reacção (139). São abordagens do PCR em tempo real, as técnicas SYBR-Green, Taqman e *molecular beacon* (140,141).

A quantidade de DNA na amostra estudada é quantificada através da fluorescência libertada durante a reacção de PCR, e registada em tempo real. Assim, a medição dos produtos de PCR é efectuada mediante o uso simultâneo de um termociclador e um fluorímetro (94).

As vantagens deste método são a rapidez, na medida em que se verificam resultados assim que a fluorescência começa a ser libertada e sem a necessidade de espera pela reacção no gel de agarose. Esta técnica apresenta, também, capacidade de quantificar bactérias numa amostra clínica e de identificar produtos resultantes de PCR directamente. A identificação directa diminui a possibilidade de contaminação(142).

O uso de técnicas quantitativas, como PCR em tempo real, pode ser útil no estudo da relação de determinada espécie com o processo infeccioso, uma vez que a quantificação precisa do número de células de cada espécie bacteriana em amostras clínicas é necessária para a compreensão da etiologia de patologias infecciosas (143).

2.2.5.2.2.1.4. Broad-Range PCR

A tecnologia de PCR também pode ser utilizada para estudar a diversidade microbiana de determinado habitat. No método de *Broad-range* PCR, os primers utilizados são complementares a regiões de um determinado gene, regiões essas comuns a um grupo de microrganismos.

A ausência de selectividade deste método pressupõem que qualquer bactéria, presente na amostra, possa ser detectada e identificada. Neste aspecto, este método é semelhante aos meios de cultura e diferente das outras técnicas moleculares (144).

Esta técnica permitiu a identificação de vários agentes bacterianos patogênicos de diversos sítios do corpo humano (96,145).

Também no caso de infecções endodônticas, foram realizados estudos com a técnica de *Broad-range* PCR, para levantamento da diversidade bacteriana.

Wade et al (1997), realizaram análise molecular do conteúdo purulento aspirado de abscessos orais. Concluíram que a maior parte dos microrganismos em estudo não eram cultiváveis e que duas espécies cultiváveis (*F.nucleatum* e *P.endodontalis*) tinham sido subestimadas nos métodos de cultura (146).

Rolph et al (2001), também avaliou a diversidade de bactérias presentes em canais radiculares infectados através do método *Broad-range* PCR. Foram recolhidas oito amostras, três de infecções primárias e cinco de infecções persistentes. Os três casos de infecção primária caracterizaram-se pela presença de géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, e *Selenomonas* (147).

2.2.5.2.2.1.5. DNA-DNA Hybridization PCR

Este método consiste no uso de sondas de DNA, segmentos simples de nucleótidos, marcados com uma radioactividade ou um sinalizador de quimioluminescência. Estes marcadores de DNA podem localizar e ligar-se a sequências de ácidos nucleicos complementares. Este método pode ser aplicado na diferenciação de espécies estreitamente relacionadas ou mesmo em subespécies (94).

O *checkerboard DNA-DNA hybridization*, é uma variante desta tecnologia, e permite a aplicação da técnica a um grande número de amostras de DNA em simultâneo. O DNA, recolhido de amostras clínicas, é colocado em diferentes pistas, numa membrana de nylon. Após a reacção de hibridação, a membrana é lavada, e as sondas de DNA presentes são detectadas mediante a ligação com um anticorpo (luminescente). Este método permite a determinação da presença de uma multidão de espécies bacterianas, em simultâneo. Isto pode acontecer numa única ou em múltiplas amostras clínicas (148).

Esta técnica foi amplamente utilizada no estudo do microbiota associado às infecções endodônticas.

Siqueira et al (2000), estudaram o microbiota de canais radiculares infectados, através da técnica de hibridização DNA-DNA. As amostras foram retiradas dos canais

radiculares de 26 dentes, assintomáticos com lesões perirradiculares. Foram encontradas 42 espécies de bactérias nas amostras clínicas. Todas as amostras apresentavam DNA bacteriano. A análise do *checkerboard* revelou que o número de espécies de bactérias por canal variou entre 1 e 17. As espécies mais prevalentes encontradas em canais radiculares infectados foram: *T. forsythia* (42% dos casos), *Haemophilus aphrophilus* (19%), *Porphyromonas gingivalis* (19%), *Corynebacterium matruchotii* (15%), *Treponema denticola* (15%), *Capnocytophaga gingivalis* (12%) e *Streptococcus intermedius* (12%). Este estudo permitiu também comprovar a presença de bactérias associadas a doença periodontal grave, no canal radicular, em 2 casos (121).

Siqueira et al (2003), voltaram a utilizar a técnica de checkerboard, mas neste estudo, em amostras de conteúdo purulento retirado de abscessos agudos de origem endodôntica. Foram analisados 27 casos com dor e edema. O número de espécies nas amostras de conteúdo purulento variou de 1 a 33. As espécies encontradas, mais prevalentes, foram: *T. forsythia* (30% dos casos); *P. gingivalis* (30%); *Streptococcus constellatus* (26%), *P.intermedia* (22%), *Prevotella nigrescens* (22%), *Fusobacterium periodonticum* (19%), *Fusobacterium nucleatum* (19%), *Eikenella corrodens* (19%), *P. endodontalis* (15%), *Actinomyces gerencseriae* (15%) e *Neisseria mucosa* (15%) (122).

2.2.5.2.2.1.6. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

A electroforese em gel com gradiente de desnaturação é utilizada na caracterização genética de comunidades bacterianas. Esta técnica consiste na amplificação do rDNA 16 S com primers não específicos e posterior análise dos produtos. O DNA do mesmo comprimento, mas constituído por sequências de pares de bases diferentes, pode ser separado (149,150).

À medida que o produto, resultante da reacção de PCR, migra no gel, vai encontrar concentrações de desnaturantes crescentes. A migração provoca a desnaturação total ou parcial do material genético. Moléculas com sequências diferentes podem ter comportamento diferente, portanto, a sua migração termina em posições distintas do gel. Os resultados finais podem ser visualizados com brometo de etídio ou técnicas de fluorescência (94).

Esta técnica permite a análise de várias amostras em simultâneo, possibilitando a comparação da estrutura microbiana de diferentes amostras. Por outro lado, permite

também acompanhar alterações nas populações bacterianas, nomeadamente após tratamento antimicrobiano (94).

A TGGE usa o mesmo princípio que a DGGE, mas substitui os químicos desnaturantes pelo efeito da temperatura (94).

Siqueira et al (2004), aplicaram a técnica de DGGE para comparar as espécies bacterianas associadas a infecções endodônticas primárias, assintomáticos e sintomáticos. Os casos sintomáticos consistiam em amostras recolhidas de dentes com abscesso. Os resultados revelaram a presença de bactérias em todos os casos examinados. A análise comparativa, das duas condições clínicas, revelou bandas que eram comuns para ambos os casos. No entanto, a maioria das bandas de DGGE parecia ser característica para determinada condição clínica, sintomática ou assintomática. Este estudo experimental conclui que houveram diferenças marcantes na composição bacteriana, entre casos assintomáticos e sintomáticos (151).

2.2.5.2.2.2. Limitações das técnicas de PCR

A capacidade de detectar células mortas ou em número muito reduzido, é de especial interesse quando se interpretam resultados de PCR numa pesquisa de microbiologia endodôntica (94).

A alta sensibilidade dos métodos de PCR pode ser um motivo de preocupação quando o estudo não é quantitativo. Como esta técnica pode detectar um número reduzido de células bacterianas, o significado dos resultados obtidos pode não estar relacionado com a causa da doença (94).

A recolha de uma amostra representativa do canal radicular é de grande dificuldade, devido às limitações físicas oferecidas pelo sistema de canais, assim como as limitações das técnicas de análise. Se as células de determinadas espécie estão presentes em número inferior ao da taxa de detecção do teste de diagnóstico, a prevalência das espécies será subestimada. Também é de ter em conta a sensibilidade necessária para a amostra clínica em questão, por exemplo, numa amostra sanguínea basta a presença de uma célula por ml (152).

No que diz respeito às infecções endodônticas, não há evidências quanto à quantidade microbiana necessária para induzir uma lesão perirradicular. Estas infecções são caracterizadas por uma flora mista, na qual espécies individuais podem

desempenhar diferentes papéis. Como o canal é previamente estéril, todas as espécies bacterianas, que colonizem a zona endodôntica, podem ser consideradas patogénicas (61).

Existem diversos factores capazes de influenciar as reacções de PCR. Quando as amostras são constituídas por pequenas quantidades de DNA em estudo, os efeitos dos inibidores encontram-se ampliados. Este facto, pode diminuir a sensibilidade do método (144).

Um dos aspectos que pode ser considerado vantagem e desvantagem em simultâneo, é a capacidade para detectar células não viáveis (mortas). Por um lado, permite detectar bactérias não cultiváveis, ou sensíveis que podem morrer durante o transporte das amostras ou isolamento (92,114,125). Por outro lado, as bactérias podiam já estar mortas quando a amostra foi recolhida. Deste modo, a sua presença não deverá ser relacionada com o processo infeccioso pois não há viabilidade das células(153,154).

Objetivos

3. Objectivos

Os objectivos deste trabalho foram:

- Identificar um grupo de seis bactérias em amostras recolhidas de tecido humano pulpar, em estado de infecção, e avaliar a eficácia do preparo biomecânico endodôntico na eliminação destes microrganismos, através do método de PCR.

- Avaliar a presença de bactérias após a abertura da câmara pulpar e após o preparo biomecânico.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostra

As amostras foram colhidas de pacientes que recorreram à consulta de Endodontia da Clínica Dentária Universitária da UCP entre Abril e Junho de 2011. Foram colhidas em pacientes submetidos a tratamento endodôntico, com infecção primária, mediante consentimento informado (Anexo II). No total foram analisadas 18 amostras provenientes de 9 pacientes diferentes, foram recolhidas amostras antes e após o preparo biomecânico, no mesmo dia.

Crítérios de exclusão: medicação antimicrobiana nos 6 meses antes da data de recolha da amostra; pacientes com patologia sistémica não controlada; pacientes submetidos a retratamento; pacientes em que foi realizada instrumentação mecanizada; dentes com câmara pulpar exposta.

4.2. Colheita das amostras

A colheita das amostras foi sempre realizada pela mesma pessoa. Elaborou-se uma folha de registo da informação necessária ao processamento da amostra. Na folha de registo constam o processo clínico do qual a amostra procede; o diagnóstico à data da colheita; identificação do binómio que realizou o tratamento; o dente de onde foi recolhida a amostra; o canal de onde foi recolhida a amostra (no caso de dente plurirradicular); a presença ou ausência de lesão apical detectada radiograficamente; exposição, ou não, da câmara pulpar ao meio oral.

4.3. Protocolo de colheita

O protocolo de colheita respeitou o de *Siqueira et al* (2005). As amostras foram recolhidas em duas fases: F1 – após abertura da câmara pulpar, antes de irrigação canal; F2- após instrumentação canal manual e irrigação (preparo biomecânico) com solução aquosa de Hipoclorito de sódio a 0,5 % – soluto de Dakin. As amostras foram recolhidas na mesma data para eliminar a influência da terapia mediata nos microrganismos. O tratamento endodôntico foi realizado em condições assépticas, com

isolamento absoluto do dente a tratar e desinfecção prévia da área adjacente, com hipoclorito de sódio. Considerou-se a cavidade de acesso completa quando a entrada de todos os canais esteve adequadamente exposta e de livre acesso. Após este procedimento, o dente e o grampo foram novamente desinfectados. A recolha das amostras foi feita, sempre pela mesma pessoa, através de limas endodônticas esterilizadas e cones de papel esterilizados – colocados durante sessenta segundos a um milímetro aproximadamente do apéx radiológico da raiz. As limas e os cones de papel, após a recolha, foram inseridos em criotubos com solução de 1 ml de Tris-EDTA-buffer (Ph 7,6). Após este procedimento, as amostras foram congeladas a -20°C.

4.4. Protocolo de extracção de ADN utilizado

O protocolo de extracção de ADN utilizado foi modificado de Komiya Ito *et al* 2010 (Anexo III). As amostras colhidas foram agitadas num vórtex durante um minuto para libertar as bactérias aderentes às pontas de papel e limas endodônticas. Destas soluções foram recolhidos 0,5 ml de amostra que foram centrifugados para a obtenção de uma pellet que foi posteriormente resuspendida em 100µl de TRIS (pH8), 100µl de EDTA e 100µl de 0,5% Tween. Foram ainda adicionados 3 µl de solução de proteinase K. Estas soluções foram aquecidas a 55°C por 1 hora e, posteriormente, a 95°C durante 5 minutos. Em seguida, foram submetidas a um choque térmico, a -20°C durante 5 minutos. Voltaram a ser fervidas a 95°C, durante 5 minutos e, por fim, foram congeladas para posterior utilização com ADN molde nas reacções de PCR.

4.5. Protocolo de amplificação de ADN em reacção de PCR

A selecção dos microrganismos a detectar com estes testes foi suportada pela bibliografia. As espécies foram seleccionadas pela sua prevalência e possível presença nas infecções endodônticas. Os primers utilizados para a amplificação do ADN das amostras recolhidas dos vários dentes foram os previamente usados por Siqueira et al (2005), que verificaram a sua especificidade e capacidade de detecção destes microrganismos em amostras recolhidas de tecido pulpar infectado. As reacções de PCR usaram a **DyNAzyme™ IIDNA** polimerase e dNTPMix(Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante e nas concentrações adaptadas e descritas no protocolo (Anexo III). Cada uma das reacções foi preparada em microtubos com o ADN de cada uma das

amostras e foi ainda elaborado um controlo positivo para 3 pares de primers (*A. actinomycetemcomitans*, *F.nucleatum* e *P.gingivalis*) O ADN que constituiu os controlos positivos foi adquirido a um banco de culturas (DSMZ) - DSM 11123- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; DSM 20709 - *Porphyromonas gingivalis*; DSM ? *Fusobacterium nucleatum*.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador, de modelo PTC-150, MinicyclerTM, da MJ Research, sendo as condições de amplificação definidas em função da sequência dos primers utilizados e dos fragmentos que se pretendiam amplificar. As condições de amplificação para cada um dos primers constam do anexo III. Os resultados das reacções de amplificação por PCR foram visualizados num transiluminador com fonte de UV em géis de agarose elaborados com o protocolo em anexo.

Resultados

5. Resultados

Foram utilizados primers relativos a 6 microrganismos diferentes. Das 6 espécies analisadas, as mais frequentes, antes da instrumentação químico-mecânica (F1), foram a *Porphyromonas gingivalis*, a *Porphyromonas endodontalis* e a *Enterococcus faecalis*, presentes nas 9 amostras. Após a instrumentação químico-mecânica (F2), a única espécie presente na totalidade das amostras foi a *Enterococcus faecalis*. A espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não foi encontrada em nenhuma amostra antes da instrumentação mecânico-química mas surge numa amostra (12) após a instrumentação (F2). A espécie *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* não foram detectada em nenhum canal radicular.

Dos canais radiculares avaliados, todos apresentavam contaminação bacteriana, para pelo menos uma espécie, tanto em F1, como em F2. No entanto, verificaram-se resultados diferentes nas duas fases.

Em F1, três espécies investigadas estavam presentes em 100% das amostras, *Porphyromonas gingivalis*, a *Porphyromonas endodontalis* e a *Enterococcus faecalis*. Por outro lado, as outras espécies não foram detectadas em nenhuma das amostras, neste grupo: *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia*.

Em F2, uma espécie analisada esteve presente em 100% das amostras: *Enterococcus faecalis*. A espécie *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* não foram, novamente, detectadas em nenhuma das amostras.

Os microrganismos predominantes em F1 foram *Porphyromonas gingivalis*, a *Porphyromonas endodontalis* e a *Enterococcus faecalis*, presentes em 100% dos canais radiculares analisados. Em F2, a espécie predominante foi *Enterococcus faecalis* (100%), seguindo-se *Porphyromonas gingivalis* (89%) e *Porphyromonas endodontalis* (56%). A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* esteve presente num único canal em F2 e em nenhum canal radicular em F1.

Discussão

6. Discussão

Nos casos em que o tratamento endodôntico é realizado sem lesão apical visível radiograficamente, é difícil estabelecer o momento em que ocorre a contaminação bacteriana do sistema canalar (155). Vários estudos têm sido realizados na tentativa de compreender a composição do microbiota envolvido (156–158).

O estudo realizado teve como objectivo confirmar a presença de bactérias associadas ao microbiota endodôntico e avaliar a eficácia do preparo biomecânico sobre esses microrganismos. O método utilizado para a análise bacteriana foi o PCR.

As técnicas de biologia molecular têm possibilitado a identificação de microrganismos pouco encontrados no microbiota endodôntico, na tentativa de compreender os agentes envolvidos na infecção. O método de PCR possibilita a análise de uma ou mais amostras clínicas, detectando espécies bacterianas diferentes. A sua grande vantagem advém do facto de conseguir identificar espécies difíceis, ou mesmo impossíveis, de avaliar nos métodos de cultura. Este método não é influenciado pela perda de viabilidade dos microrganismos durante o transporte das amostras. Porém, a detecção de microrganismos pode ocorrer através de células mortas, originando falsos positivos (148). No presente estudo, o método mais fiável seria o Real-time PCR, que permite quantificar as células bacterianas. Desta forma, seria possível verificar se houve um decréscimo da quantidade de células bacterianas após o preparo químico-mecânico. Desta forma, apenas foi possível verificar se o microrganismo continuava presente no canal radicular (94).

Os métodos moleculares de diagnóstico revelaram um aumento na complexidade das infecções endodônticas. Um canal radicular infectado pode apresentar de 10 a 30 espécies, e em casos pontuais chegar às 50 espécies (157). Muitos dos agentes patogénicos colonizadores do canal radicular, são também os principais agentes suspeitos associados a patologia periodontal, como por exemplo a *P.gingivalis* (159).

Na maioria dos casos em que o tratamento endodôntico é insatisfatório, o insucesso deve-se a uma falha no controlo e eliminação da contaminação bacteriana (160). Gomes *et al* (1996) avaliaram as diferenças na susceptibilidade do microbiota endodôntico ao preparo químico-mecânico e concluíram que algumas espécies apresentaram maior resistência(161). Quando Ferrari *et al* (2005) avaliaram o efeito dos procedimentos químico-mecânicos endodônticos sobre *Enterococcus*, concluíram que

E.faecalis e *E.faecium* se mostraram resistentes à remoção por meio de preparo biomecânico, embora seja de considerar que o estudo foi realizado sem grupo controle (162). Estas conclusões estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, dado que a espécie *E.faecalis* foi detectada em todas as amostras, mesmo após a instrumentação químico-mecânica. No entanto, estes resultados não estão de acordo com as afirmações de Siren *et al* (1997), de que as bactérias entéricas não se encontram comumente no microbiota associado a infecções primárias que é o caso de todas as amostras colhidas (92).

Os microrganismos que sobrevivem aos métodos de desinfecção podem permanecer viáveis. Isto depende da quantidade de nutrientes disponíveis no canal radicular e da capacidade de sobrevivência de cada espécie em situações de carência nutricional. Siqueira *et al* (2008), propõem várias hipóteses de defesa das bactérias face à instrumentação e irrigação endodônticas: formação de nichos bacterianos firmemente aderidos às paredes canulares; colonização de áreas distantes ao canal principal (istmos, ramificações e túbulos dentinários); resistência ao agente antimicrobiano em uso; formação de estruturas protegidas por uma matriz de polissacarídeos (163).

Os resultados do presente estudo reforçam a ideia de Shuping *et al* (2000), que concluíram que a fase de instrumentação é fundamental para a redução do microbiota dos canais radiculares. No entanto, este método não é suficiente para eliminar totalmente os microrganismos dos canais estudados. Os autores destacam a importância de uma terapia intracanal mediata que poderá auxiliar na redução da contaminação endodôntica (37).

As bactérias que permanecem no canal, mesmo após a medicação mediata, podem originar infecções secundárias endodônticas ou periodontite apical, levando à necessidade de um retratamento (164).

Os microrganismos detectados nos canais radiculares normalmente são derivados de bactérias presentes originalmente no canal (3). Por outro lado, os microrganismos podem ser introduzidos no canal por procedimentos inadequados durante o tratamento endodôntico, como por exemplo, um incorrecto isolamento absoluto do dente. Desta forma, podemos justificar a possibilidade de um microrganismo não ser detectado na amostra inicial, mas ter sido encontrado após a instrumentação químico-mecânica, como aconteceu com a espécie *A.actinomycescomitans*. Estes resultados sugerem a importância de um isolamento adequado do dente durante a intervenção endodôntica. Neste caso, como a espécie

encontrada é fortemente associada à presença de doença periodontal (159), a contaminação poderá ter sido feita através de uma bolsa periodontal.

Os resultados do presente estudo demonstram que as espécies *F. nucleatum* e *P. Intermedia* não foram detectadas em nenhuma amostra, nem após a abertura da câmara pulpar, nem após o preparo biomecânico. No entanto, estas espécies foram previamente detectadas em casos de infecção endodôntica (165,166). As amostras recolhidas são constituídas por pequenas quantidades de DNA e, neste caso, os efeitos dos inibidores encontram-se ampliados. Este facto, pode diminuir a sensibilidade do método, e justificar os resultados obtidos (144). Por outro lado, o reduzido número de amostras recolhidas pode condicionar os resultados obtidos.

Conclusão

7. Conclusões

A identificação das seis espécies pesquisadas, nos canais radiculares estudados, permitiu concluir que:

- I. A infecção endodôntica tem um carácter polimicrobiano.
- II. Os microrganismos mais frequentes após a abertura da câmara pulpar foram *Porphyromonas gingivalis*, a *Porphyromonas endodontalis* e a *Enterococcus faecalis*.
- III. A *Enterococcus faecalis* permaneceu identificável em todos os canais, mesmo após a aplicação do método.
- IV. O preparo biomecânico foi eficaz na eliminação de *P.gingivalis* e *P.endodontalis*. No entanto, este método não foi eficaz na remoção de *Enterococcus faecalis*, pelo que é de justificar o desenvolvimento de mais trabalhos de investigação.

Bibliografia

8. Bibliografia

1. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1965 Set;20(3):340–9.
2. MöLler åKe JR, Fabricius L, DahlÉN G, öHman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Eur J Oral Sci*. 1981 Dez;89(6):475–84.
3. SjöGren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*. 2003 Out;30(5):297–306.
4. Camp JH. Diagnosis Dilemmas in Vital Pulp Therapy: Treatment for the Toothache Is Changing, Especially in Young, Immature Teeth. *Journal of Endodontics*. 2008 Jul;34(7):S6–12.
5. Fouad A. *Endodontic microbiology*. Ames Iowa: Wiley-Blackwell; 2009.
6. Cisneros-Cabello R, Segura-Egea JJ. Relationship Of Patient Complaints And Signs To Histopathologic Diagnosis Of Pulpal Condition. *Australian Endodontic Journal*. 2005 Abr;31(1):24–7.
7. Levin LG, Law AS, Holland GR, Abbott PV, Roda RS. Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. *Journal of Endodontics*. 2009 Dez;35(12):1645–57.
8. Schilder. Cleaning and shaping the root canal. [Internet]. 1974 [citado 2011 Ago 20];A
9. Siqueira JF, Lima KC, Magalhães FAC, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *Journal of Endodontics*. 1999 Mai;25(5):332–5.
10. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1983 Mar;55(3):307–12.
11. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dent Traumatol*. 1985 Out;1(5):170–5.

12. Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *Journal of Endodontics*. 1981 Jan;7(10):466–9.
13. Vianna M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 2004 Jan;97(1):79–84.
14. Gomes BPFA, Ferraz CCR, M. E. V, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001 Set;34(6):424–8.
15. Beltz R, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative Analysis of the Solubilizing Action of MTAD, Sodium Hypochlorite, and EDTA on Bovine Pulp and Dentin. *Journal of Endodontics*. 2003 Mai;29(5):334–7.
16. Foley DB, Weine FS, Hagen JC, deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: An in vitro study. *Journal of Endodontics*. 1986 Jun;9(6):236–41.
17. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*. 2003 Fev;36(2):75–85.
18. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal*. 2006 Jan;39(1):10–7.
19. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dental J*. 1998 Ago;43(3):250–6.
20. Murray P. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.
21. Block S. *Disinfection, sterilization and preservation*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991.
22. Becking A. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment Report of three cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1991 Mar;71(3):346–8.
23. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*. 1989 Mai;15(5):224–6.

24. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation - literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000 Mai;33(3):186–93.
25. Tanomarufilho M, Leonardo M, Bezerradasilva L. Effect of Irrigating Solution and Calcium Hydroxide Root Canal Dressing on the Repair of Apical and Periapical Tissues of Teeth with Periapical Lesion. *Journal of Endodontics.* 2002 Abr;28(4):295–9.
26. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *Journal of Endodontics.* 1994 Jun;20(6):276–8.
27. Leonardo MR, Filho MT, Silva LAB, Filho PN, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics.* 1999 Mar;25(3):167–71.
28. Delany G, Patterson S, Miller C, Newton C. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* 1982 Mai;53(5):518–23.
29. Siqueira JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics.* 1997 Mar;23(3):167–9.
30. Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006 Nov;39(11):878–85.
31. Dametto FR, Ferraz CCR, de Almeida Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2005 Jun;99(6):768–72.
32. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J. Periodontol.* 1986 Jun;57(6):370–7.
33. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *Journal of Endodontics.* 1997 Abr;23(4):229–31.
34. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986 Jun;112(6):863–9.

35. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006 Jun;39(6):484–92.
36. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial Activity of 2% Chlorhexidine Gluconate and 5.25% Sodium Hypochlorite in Infected Root Canal: In Vivo Study. *Journal of Endodontics.* 2004 Fev;30(2):84–7.
37. Shuping G, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of Intracanal Bacteria Using Nickel-Titanium Rotary Instrumentation and Various Medications. *Journal of Endodontics.* 2000 Dez;26(12):751–5.
38. Sant’anna AT, Spolidório LC, Ramalho LTO. Histological analysis of the association between formocresol and endotoxin in the subcutaneous tissue of mice. *Braz. Dent. J.* 2008;19(1):40–5.
39. Silva LAB da, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004;15(2):109–14.
40. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003 Nov;36(11):733–9.
41. Oliveira L, Leao M, Carvalho C, Camargo C, Valera M, Jorge A, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *Journal of Dentistry.* 2005 Fev;33(2):107–14.
42. Poltorak A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science.* 1998 Dez;282(5396):2085–8.
43. Siqueira JR. The antibacterial activity of calcium hydroxide camphorated paramonochlorophenol glycerin past containing differet amounts of iodorform on obligate and facultative anaerobic bacteria. 1997;
44. Barbosa CAM, Gonçalves RB, Siqueira JF, De Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *Journal of Endodontics.* 1997 Mai;23(5):297–300.
45. Telles. LILACS-Avaliação da toxicidade de materiais endodônticos em células-tronco da polpa dentária; Toxicity evaluation of endodontic materials in dental pulp stem cells [Internet]. [citado 2011 Ago 31];Available from: <http://bases.bireme.br/cgi->

- bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=564349&indexSearch=ID
46. LILACS-Propriedades do paramonoclorofenol canforado e paramonoclorofenol canforado associado ao hidróxido de cálcio; Proprieties of Camphorated Paramonochlorofenol and Camphorated [Internet]. [citado 2011 Ago 29];Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=518856&indexSearch=ID>
 47. Nishimura H. Ability of root canal antiseptics used in dental practice to induce chromosome aberrations in human dental pulp cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008 Jan;649(1-2):45–53.
 48. Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics*. 1990 Oct;16(10):498–504.
 49. Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy? a five-year retrospective study. *Int Endod J*. 1993 Nov;26(6):321–33.
 50. Friedman S, Lost C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. *Journal of Endodontics*. 1995 Jul;21(7):384–90.
 51. Lin L, Pascon E, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1991 Mai;71(5):603–11.
 52. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics*. 1992 Dez;18(12):625–7.
 53. Chavez de Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003 Jul;36(7):500–8.
 54. Cheung GS. Endodontic failures--changing the approach. *Int Dent J*. 1996 Jun;46(3):131–8.
 55. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001 Jan;34(1):1–10.

56. Gomes B, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal*. 1996;29(4):235–41.
57. Bagg J. *Essentials of microbiology for dental students*. 2nd ed. Oxford;;New York: Oxford University Press; 2006.
58. Mims C. *Mims' pathogenesis of infectious disease*. 5th ed. San Diego Calif. ;;London: Academic; 2001.
59. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Nov;43(11):5721–32.
60. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003 Feb;149(2):279–94.
61. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endodontic Topics*. 2003 Nov;6(1):3–28.
62. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1994 Out;78(4):522–30.
63. Dai X-F, Cate ART, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Archives of Oral Biology*. 1991;36(10):775–8.
64. Liu T, Gibbons RJ. Binding of streptococci of the «mutans» group to type 1 collagen associated with apatitic surfaces. *Oral Microbiol Immunol*. 1990 Jun;5(3):131–6.
65. Liu T, Gibbons RJ, Hay DI. *Streptococcus cricetus* and *Streptococcus rattus* bind to different segments of collagen molecules. *Oral Microbiol Immunol*. 1990 Jun;5(3):143–8.
66. Switalski LM, Butcher WG, Caufield PC, Lantz MS. Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect. Immun*. 1993 Out;61(10):4119–25.
67. Love RM, Jenkinson HF. INVASION OF DENTINAL TUBULES BY ORAL BACTERIA. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002 Mar;13(2):171–83.
68. Mejare B, Mejare I, Edwardsson S. Acid etching and composite resin restorations. A culturing and histologic study bacterial penetration. *Dent Traumatol*. 1987 Feb;3(1):1–5.

69. Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Archives of Oral Biology*. 1994 Mar;39(3):185–90.
70. Izumi T, Yamada K, Inoue H, Watanabe K, Nishigawa Y. Fibrinogen/fibrin and fibronectin in the dentin-pulp complex after cavity preparation in rat molars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1998 Nov;86(5):587–91.
71. Love RM. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Feb;17(1):32–7.
72. Hahn C. The effects of immunoglobulins on the convective permeability of human dentine in vitro. *Archives of Oral Biology*. 1997 Dez;42(12):835–43.
73. Pashley DH. Dentin permeability, dentin sensitivity, and treatment through tubule occlusion. *Journal of Endodontics*. 1986 Jan;12(10):465–74.
74. Goldberg M, Smith AJ. CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004 Jan;15(1):13–27.
75. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of Oral Biology*. 1976;21(6):355–62.
76. Bowden GH. Microbiology of root surface caries in humans. *J. Dent. Res*. 1990 Mai;69(5):1205–10.
77. Van Houte J. Role of Micro-organisms in Caries Etiology [Internet]. [citado 2011 Ago 29]; Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/73/3/672.short>
78. Hoshino E. Predominant Obligate Anaerobes in Human Carious Dentin. *Journal of Dental Research*. 1985 Out;64(10):1195–8.
79. Van Houte J. The Predominant Cultivable Flora of Sound and Carious Human Root Surfaces [Internet]. [citado 2011 Ago 29]; Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/73/11/1727.short>
80. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro Infection and of Dentinal Tubules. *Journal of Dental Research*. 1987 Ago;66(8):1375–9.
81. Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1974 Feb;37(2):257–70.

82. Giuliana G, Ammatuna P, Pizza G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol*. 1997 Jul;24(7):478–85.
83. Ter Steeg PF, Van Der Hoeven JS. Development of Periodontal Microflora on Human Serum. *Microb Ecol Health Dis*. 1989 Jan;2(1):1–10.
84. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *Journal of Endodontics*. 1989 Jan;15(1):13–9.
85. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *Journal of Endodontics*. 1992 Set;18(9):427–30.
86. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol. Immunol*. 1992 Out;7(5):257–62.
87. Takazoe I, Nakamura T, Okuda K. Colonization of the subgingival area by *Bacteroides gingivalis*. *J. Dent. Res*. 1984 Mar;63(3):422–6.
88. Van Steenberghe TJM, Van Winkelhoff AJ, Mayrand D, Grenier D, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* sp. nov., an Asaccharolytic Black-Pigmented *Bacteroides* Species from Infected Dental Root Canals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984 Abr;34(2):118–20.
89. Kolenbrander PE. Surface recognition among oral bacteria: multigeneric coaggregations and their mediators. *Crit. Rev. Microbiol*. 1989;17(2):137–59.
90. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002 Set;66(3):486–505.
91. Jordan HV, Krasse B, Möller A. A method of sampling human dental plaque for certain «caries-inducing» streptococci. *Archives of Oral Biology*. 1968 Ago;13(8):919–27.
92. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*. 2007 Set;30(2):91–5.
93. Relman DA. Emerging infections and newly-recognised pathogens. *Neth J Med*. 1997 Mai;50(5):216–20.
94. Siqueirajr J, Rocas I. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1—Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. *Journal of Endodontics*. 2005 Jun;31(6):411–23.

95. Relman DA. New technologies, human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *J. Infect. Dis.* 2002 Dez 1;186 Suppl 2:S254–8.
96. Wade W. Unculturable bacteria--the uncharacterized organisms that cause oral infections. *JRSM.* 2002 Fev;95(2):81–3.
97. Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J. Infect. Dis.* 1993 Jul;168(1):1–8.
98. Rappé MS, Giovannoni SJ. T *<scp>HE</scp>* U *<scp>NCULTURED</scp>* M *<scp>ICROBIAL</scp>* M *<scp>AJORITY</scp>*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003 Out;57(1):369–94.
99. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 1999 Set;29(3):475–86; quiz 487–8.
100. Perkins BA, Relman D. Explaining the unexplained in clinical infectious diseases: looking forward. *Emerging Infect. Dis.* 1998 Set;4(3):395–7.
101. Nikkari S, Lopez FA, Lepp PW, Cieslak PR, Ladd-Wilson S, Passaro D, et al. Broad-range bacterial detection and the analysis of unexplained death and critical illness. *Emerging Infect. Dis.* 2002 Fev;8(2):188–94.
102. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 Nov;65(11):4799–807.
103. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol. Immunol.* 2002;46(8):535–48.
104. Wade WG. Non-culturable bacteria in complex commensal populations. *Adv. Appl. Microbiol.* 2004;54:93–106.
105. Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000 Jun;3(3):238–43.
106. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis.* 2003;9 Suppl 1:54–62.
107. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol.* 2000. 1995 Fev;7:69–82.

108. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J.* 2002 Ago;35(8):698–702.
109. Williams BL. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. - UKPMC Article - UK PubMed Central [Internet]. 1983 [citado 2011 Ago 30];Available from: <http://ukpmc.ac.uk/articles/PMC270903>
110. Sakamoto H, Kato H, Sato T, Sasaki J. Semiquantitative bacteriology of closed odontogenic abscesses. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 1998 Mai;39(2):103–7.
111. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and Cultural Analysis of the Microflora Associated with Endodontic Infections. *Journal of Dental Research.* 2002 Nov;81(11):761–6.
112. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 1995 Mar;59(1):143–69.
113. Kato C, Li L, Tamaoka J, Horikoshi K. Molecular analyses of the sediment of the 11,000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles.* 1997 Ago;1(3):117–23.
114. Wilson K H. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. [Internet]. 1996 [citado 2011 Ago 30];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168008/>
115. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Mar 23;101(12):4250–5.
116. Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 1998 Jan;180(2):366–76.
117. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991 Dez;29(12):2838–42.
118. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science.* 1999 Mai 21;284(5418):1308–10.
119. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3770–83.

120. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod.* 1997 Jul;23(7):433–8.
121. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Jun;89(6):744–8.
122. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Oct;92(4):451–7.
123. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod.* 2003 Jun;29(6):390–3.
124. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 1990 Abr;262(4):56–61, 64–5.
125. Siqueira J. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of Dentistry.* 2003 Jul;31(5):333–9.
126. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan;239(4839):487–91.
127. Whelen AC, Persing DH. THE ROLE OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTION IN THE CLINICAL MICROBIOLOGY LABORATORY ¹. *Annu. Rev. Microbiol.* 1996 Oct;50(1):349–73.
128. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ.* 2000 Ago 8;163(3):301–9.
129. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Santos KR. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.* 2000 Oct;15(5):335–7.
130. Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004 Oct;19(5):336–9.
131. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR, Coelho AM. «Red complex» (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Abr;91(4):468–71.

132. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):20–6.
133. Baumgartner JC, Khemaleelakul S-usa, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003 Dez;29(12):794–7.
134. Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Arch. Oral Biol.* 2003 Jul;48(7):495–502.
135. McPherson M. *PCR.* Oxford ;New York NY: BIOS ;;Springer; 2000.
136. Rocas I, Siqueirajr J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. *Journal of Endodontics.* 2004 Mai;30(5):315–20.
137. Dieffenbach C. *PCR primer.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory press; 2003.
138. Siqueirajr J, Rocas I. Simultaneous Detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in Endodontic Infections by 16S rDNA-directed Multiplex PCR. *Journal of Endodontics.* 2004 Dez;30(12):851–4.
139. Belgrader P, Benett W, Hadley D, Richards J, Stratton P, Mariella R Jr, et al. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science.* 1999 Abr 16;284(5413):449–50.
140. Cashion AK, Driscoll CJ, Sabek O. Emerging genetic technologies in clinical and research settings. *Biol Res Nurs.* 2004 Jan;5(3):159–67.
141. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004 Mar;10(3):190–212.
142. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 Fev;2(2):151–9.
143. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2362–5.
144. Persing D. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice.* Washington D.C.: ASM Press; 2004.
145. Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *J. Clin. Pathol.* 2000 Jan;53(1):71–5.

146. Wade WG, Spratt DA, Dymock D, Weightman AJ. Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. *Clin. Infect. Dis.* 1997 Set;25 Suppl 2:S235–6.
147. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J. Clin. Microbiol.* 2001 Set;39(9):3282–9.
148. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. «Checkerboard» DNA-DNA hybridization. *BioTechniques.* 1994 Out;17(4):788–92.
149. Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1985 Mai 10;13(9):3131–45.
150. Muyzer. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. [Internet]. 1993 151. Siqueira JF, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiology and Immunology.* 2004 Dez;19(6):363–70.
152. Boissinot M, Bergeron MG. Toward rapid real-time molecular diagnostic to guide smart use of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002 Out;5(5):478–82.
153. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993 Out;59(10):3513–5.
154. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J. Microbiol. Methods.* 2003 Mai;53(2):175–83.
155. Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. <![CDATA[Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics]]>. *J. Appl. Oral Sci.* [Internet]. 2004 Jun [citado 2011 Ago 29];12(2). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572004000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
156. Gomes BPF, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994 Nov;27(6):291–8.

157. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3314–9.
158. Egan MW, Spratt DA, Ng Y-L, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2002 Abr;35(4):321–9.
159. Socransky SS, Haffajee AD. The Nature of Periodontal Diseases*. *Annals of Periodontology.* 1997 Mar;2(1):3–10.
160. Nair PNR, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars☆☆☆. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 1999 Mai;87(5):617–27.
161. Gomes BPF, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996 Jul;29(4):235–41.
162. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J.* 2005 Jun;38(6):372–80.
163. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291–301.e3.
164. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after «one-visit» endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2005 Fev;99:231–52.
165. Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005 Ago;20(4):211–5.
166. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992 Out;7(5):257–62.

Anexos

9. Anexos

Anexo I

Dados clínicos das amostras recolhidas

Canal	Paciente	Dente	Diagnóstico	Lesão apical	Amostra F1	Amostra F2
1	21916	12	Necrose	Sim	1	2
2	21888	14	Pulpite Irreversível	Não	3	4
3	22190	45	Necrose	Sim	5	6
4	17771	22	Necrose	Sim	7	8
5	22330	45	Pulpite Irreversível	Não	9	10
6	22239	16	Necrose	Não	11	12
7	15451	15	Pulpite Irreversível	Não	13	14
8	21409	22	Pulpite Irreversível	Sim	15	16
9	15530	46	Pulpite Irreversível	Não	17	18

Anexo II

Termo de esclarecimento

EFICÁCIA DA TERAPIA BIOMECÂNICA NUM GRUPO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOTA ENDODÔNTICO

OBJECTIVO: *O objectivo será avaliar a acção antimicrobiana da terapia biomecânica endodôntica. Esta terapia pode auxiliar no combate à infecção, como tal, os microorganismos presentes na infecção endodôntica serão isolados e identificados.*

Para que servirá a sua participação?

Os resultados obtidos irão auxiliar na terapia endodôntica, ajudando a entender os insucessos de algumas terapias. Com esta pesquisa poderemos verificar os microorganismos que sobrevivem após a instrumentação e irrigação.

Há dificuldades na recolha de amostras?

A colheita das amostras de bactérias é simples e faz-se através de um procedimento constituinte do tratamento endodôntico realizado na Clínica Universitária.

Quais os benefícios?

Os benefícios estão relacionados com o desenvolvimento de um tratamento endodôntico mais eficaz, baseado nos resultados da pesquisa clínica.

O procedimento de colheita das bactérias não irá interferir no tratamento do canal, ou seja, não irá interferir no sucesso do tratamento.



Termo de consentimento informado

Declaro, com a finalidade de participante, que eu,

me disponho a participar na pesquisa intitulada “EFICÁCIA DA TERAPIA BIOMECÂNICA NUM GRUPO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOTA ENDODÔNTICO” e permito a divulgação dos dados clínicos e microbiológicos obtidos nesta pesquisa. Estou consciente dos objetivos desta pesquisa, e de todos os procedimentos, e concordo com a metodologia para colheita de amostras microbiológicas do(s) dente(s) submetido(s) ao tratamento endodôntico, na Clínica Universitária da Universidade Católica Portuguesa.

Estou também consciente da minha liberdade, para me recusar a participar ou para retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem ser penalizado e sem prejuízo ao meu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Esta investigação tem como responsável o Professor Doutor Manuel Paulo e a aluna Cátia Sofia Reis, do 5ºano.

Viseu, de 20

O paciente,

O aluno,

Anexo III

Reagentes e soluções

- Solução salina esterilizada;
- TRIS (pH8);
- EDTA;
- Tween 0,5%;
- TAE;
- Agarose;
- Brometo de etídeo;
- Proteinase K;
- DyNAzyme™;II DNA polimerase;
- dNTP Mix (Finnzymes);
- Marcador Lambda
- Controlo positivo adquirido de um banco de culturas (DSMZ) para *F.nucleatum*, *P.gingivalis* e *A.actynomicetemcomitans*

Equipamentos

- Micropipetas;
- Tina de electroforese Bio-Rad (Power pac 300)
- Termociclador (modelo PTC-150, Minicycler™ da MJ Research);
- Transiluminador UV Vilber Lourmat;
- Centrífuga Hettrich Zentrufuger (Mikro 22R);
- Arca frigorífica -20° C Brandt;
- Banho-maria Stuart Scientific (Bibby);
- Bloco de aquecimento Stuart Scientific (Bibby) ;
- Vortex Velp Scientifica;
- Incubadora com plataforma de agitação infors HT;
- Balança analítica Scaltec .

Protocolo de preparo das amostras e extração de DNA

- VIII. Recolher amostra bacteriana dos cones de papel/limas endodônticas
 - 1.1. Descongelar
 - 1.2. Vortex durante 1min
 - 1.3. Remover cones de papel/lima endodôntica com pinça passada na chama.
- IX. Centrifugar a solução 10 min a 13.000 rpm
- X. Descartar o sobrenadante
- XI. Ressuspender *pellet* em 100µL 50mM Tris-HCl (Ph8), 100µL de 1mM EDTA e 100µL de 0.5% Tween
- XII. Adicionar 3 microlitros de Proteinase K
- XIII. Incubar a 55°C por 1 hora
- XIV. Passar para 95°C durante 1 minuto
- XV. Congelar durante um minuto
- XVI. Passar a 95°C 1 minuto
- XVII. Congelar ou refrigerar.

Protocolo de reacção de PCR

- 5 µl de amostra adicionar 45µl de master mix, (10 Mg²⁺, 50 mMGC1, dNTPs, Primer específico 1 µl foard e primer reverse 1µl, Taq)
- Colocar as amostras no termociclador respeitando o seguinte programa:
 - Desnaturação inicial 10 min a 95°C
 - Desnaturação 30 seg. 95°C
 - Annealing 30 seg 60°C, 50°C ,45°C
 - Extensão do primer a 72 °C durante 1 min
 - Extensão final 72° C 10 min
- Repetir a sequência 32 vezes

Protocolos utilizados para a realização de gel de agarose a 2%

a) Protocolo utilizado para *P.gingivalis*, *F.nucleatum* e *A.actinomycetemcomitans*:

- 60 ml, de TAE + 1,20g de agarose;
- Colocação desta solução 3 min no microondas até á sua completa dissolução, agitar de 30 em 30 s, deixar arrefecer até à temperatura de 60 °C;
- Adicionar 3 µl de brometo de etídeo.

As soluções preparadas foram carregadas contendo 25 µl de amostra e 5 µl de corante de carregamento.

b) Protocolo utilizado para *P.intermedia*, *P.endodontalis* e *E.faecalis*:

- 60 ml, de TAE + 1,20g de agarose;
- Colocação desta solução 3 min no microondas até á sua completa dissolução, agitar de 30 em 30 s, deixar arrefecer até à temperatura de 60 °C;
- Depois de correr as amostras no gel, corar com 200ml de água e 40 µl de brometo de etídeo, durante 5 min. Descorar em água por 10 minutos e observar.

As soluções preparadas foram carregadas contendo 25 µl de amostra e 5 µl de corante de carregamento.

Anexo IV

Fotografias

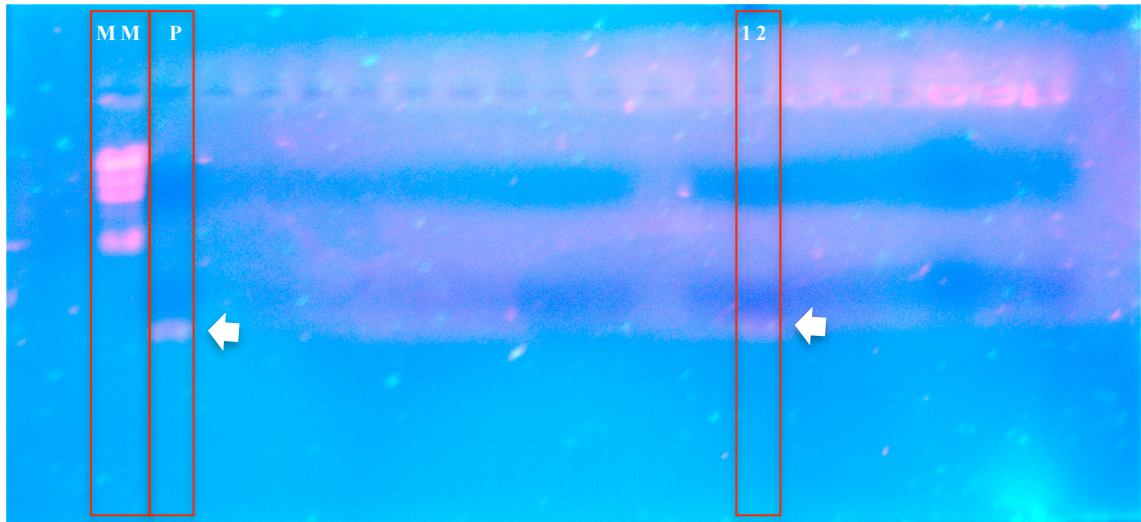


Ilustração 1 – Gel de electroforese relativo à análise de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, onde se colocaram 18 amostras de tecido pulpar. MM- Marcador de peso molecular; P- Controlo positivo. As caixas vermelhas indicam os poços em que são visíveis bandas correspondentes a DNA (setas).

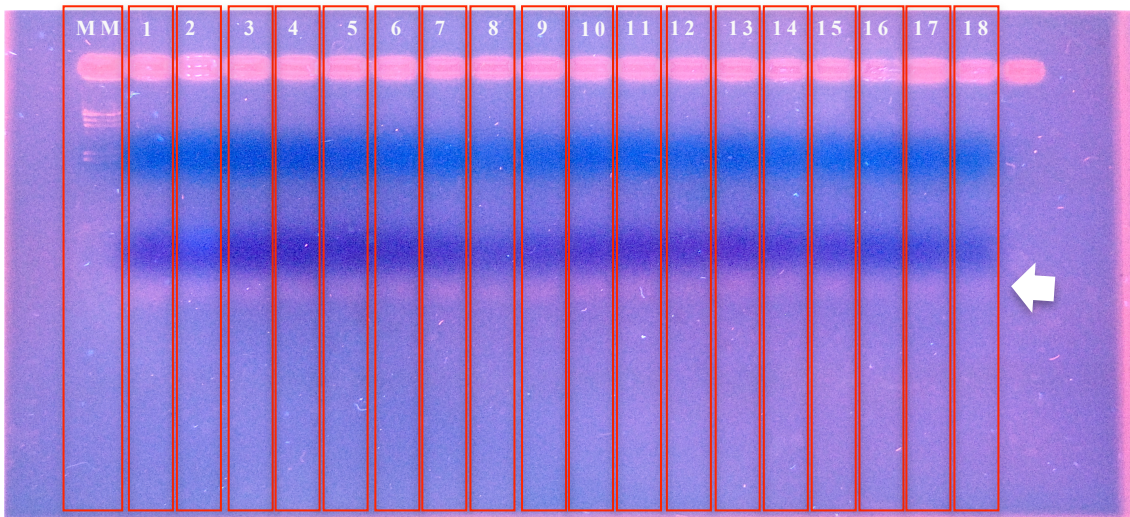


Ilustração 2 – Gel de electroforese relativo à análise de *Enterococcus faecalis*, onde se colocaram 18 amostras de tecido pulpar. MM- Marcador de peso molecular. As caixas vermelhas indicam os poços em que são visíveis bandas correspondentes a DNA (setas).

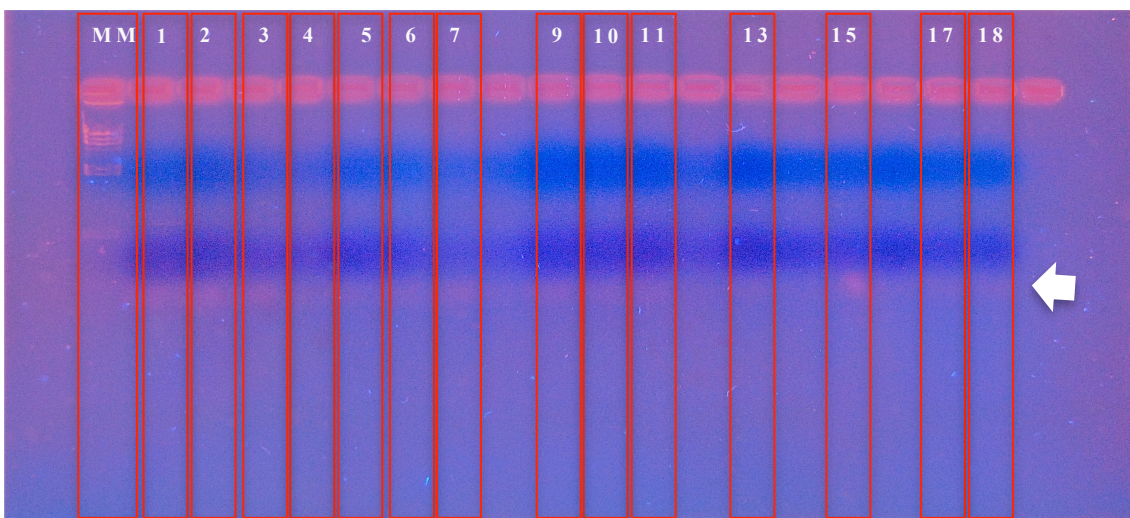


Ilustração 3– Gel de electroforese relativo à análise de *Porphyromona endodontalis*, onde se colocaram 18 amostras de tecido pulpar. MM- Marcador de peso molecular. As caixas vermelhas indicam os poços em que são visíveis bandas correspondentes a DNA (setas).

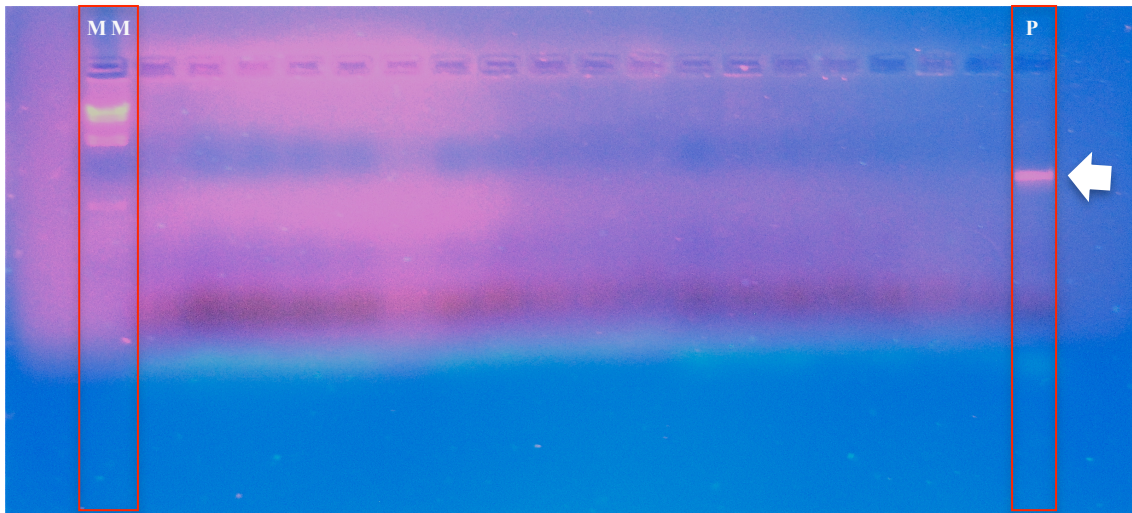


Ilustração 4– Gel de electroforese relativo à análise de *Fusobacterium nucleatum*, onde se colocaram 18 amostras de tecido pulpar. MM- Marcador de peso molecular; P- Controlo positivo.

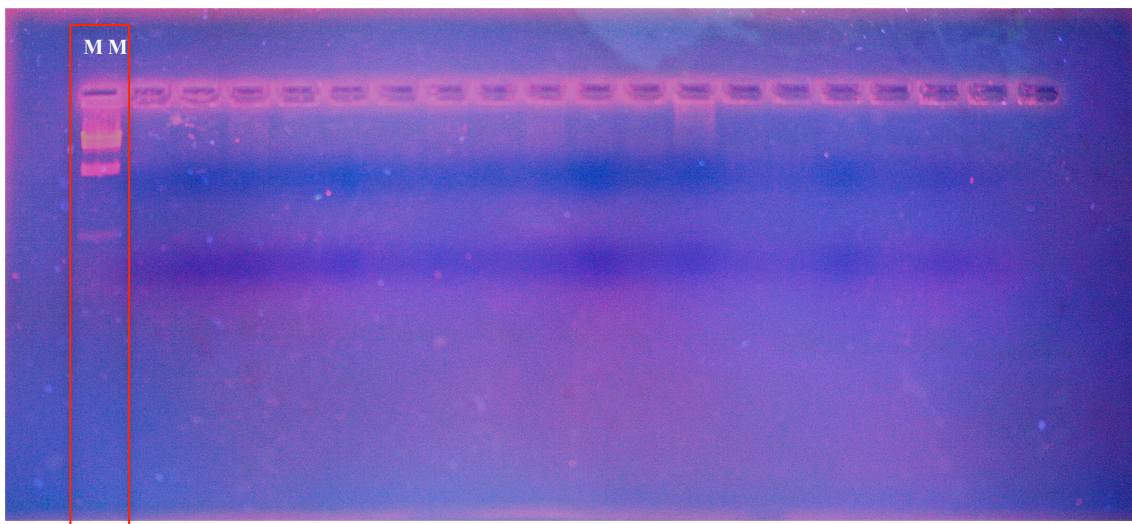


Ilustração 5 – Gel de electroforese relativo à análise de *Prevotella intermedia*, onde se colocaram 18 amostras de tecido pulpar. MM- Marcador de peso molecular.

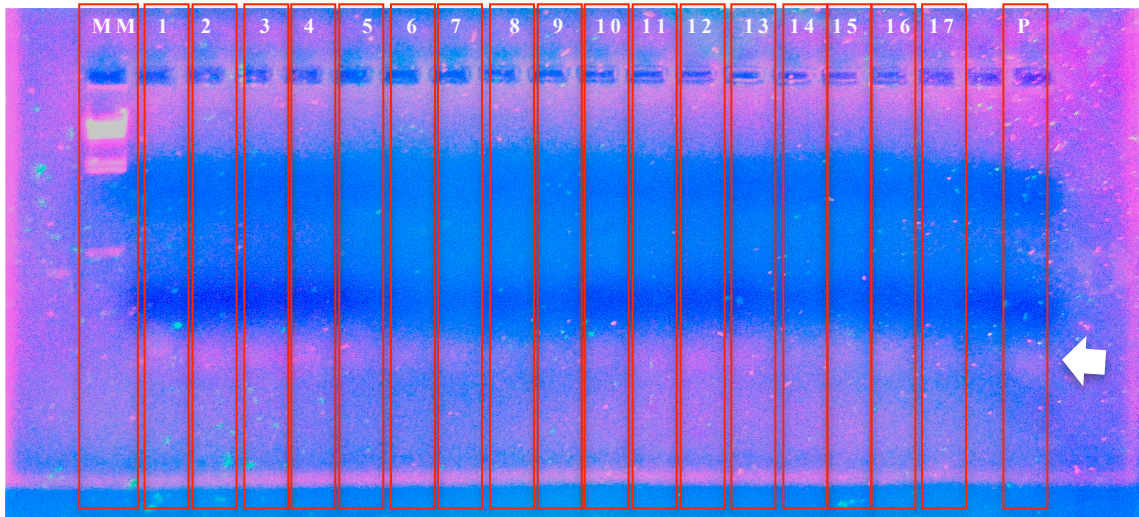


Ilustração 6 – Gel de electroforese relativo à análise de *Porphyromona gingivalis*, onde se colocaram 18 amostras de tecido pulpar. MM- Marcador de peso molecular; P- Controlo positivo. As caixas vermelhas indicam os poços em que são visíveis bandas correspondentes a DNA (setas).