

NELY CRISTINA MEDEIROS CAIRES

**ESTUDO *IN VITRO* DAS INTERAÇÕES BACTERIANAS
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRODUZIDA(S)
POR AMOSTRA DE
*C.butyricum***

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE - MARÇO 2005

NELY CRISTINA MEDEIROS CAIRES

**ESTUDO *IN VITRO* DAS INTERAÇÕES BACTERIANAS
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
SUBSTÂNCIA(S) ANTAGONISTA(S) PRODUZIDA(S)
POR AMOSTRA DE
*C.butyricum***

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientadores: Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho (FO - UFMG)
Prof. Jacques Robert Nicoli (ICB – UFMG)

Colaboradores: Prof^ª Regina Maria Nardi Drummond (ICB- UFMG)
Prof. Luiz de Macedo Farias (ICB – UFMG)
Prof^ª Maria Auxiliadora R. de Carvalho (ICB – UFMG)

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE - MARÇO 2005**

Dedico este trabalho:

Ao Almário; meu Porto Seguro! Pela Paciência, Amor e Compreensão nos momentos de “crise”. E por acreditar em mim sempre!

A meus pais, grandes incentivadores! Obrigada por terem entendido a minha ausência em muitos momentos e por contribuírem para o meu “crescimento”. Sem vocês, também, eu não chegaria até aqui.

A Milene, Eloísa e Adriel, meus irmãos queridos! Obrigada pelo apoio e confiança de sempre! Sem vocês a vida não teria cor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, razão da minha existência e para quem vivo, por ter concedido a mim mais esta vitória; por ter me carregado no colo nos momentos mais difíceis; por me fazer compreender que TUDO tem o seu TEMPO. Obrigada porque este é o tempo de colher os frutos desta jornada. Obrigada pelo sustento, amparo e sabedoria. A vida sem Ti não tem sentido!

Ao Professor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, a minha gratidão por acreditar em mim, investindo assim sua confiança; por sua contribuição em minha formação e pela oportunidade de “crescimento”. Pela competência e segurança com que conduziu este trabalho. Obrigada por me ensinar a amar ainda mais a Endodontia. Antes, uma arte para mim; agora, ciência e arte.

Ao Professor Jacques Robert Nicoli, por ter aberto as “portas” de seu Laboratório; pela paciência, apoio, carinho e atenção sempre; pelas valiosas sugestões; pela segurança a mim transmitida; por estar sempre disponível, mesmo tão ocupado.

À Professora Regina Maria Nardi Drummond, pelo incentivo; por ter me ensinado tanto com seu exemplo de vida e dedicação à Ciência; pelas valiosas sugestões durante todo o trabalho; pela atenção e dedicação. Obrigada por me encorajar sempre!

Ao Professor Luiz de Macêdo Farias e à Professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, pela disponibilidade em algumas etapas da pesquisa e pela valiosa contribuição ao nosso estudo. Obrigada pela atenção a mim dispensada sempre que solicitados.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da disciplina de Endodontia FO/UFMG: Claudia Beatriz, Helena Pereira Machado Carvalhais, Juliana Vilela Bastos, Kátia Lucy de Melo Maltos, Luiz, Maria Guiomar Bahia, Sandra de Melo Maltos e Sandra Casati Picinin pela oportunidade de aprendizado e convivência.

À Professora Maria Ilma Soares Cortês, pelo apoio e incentivo no início do curso.

À Aline, bolsista (CNPq), pelo auxílio, paciência e dedicação em todo o trabalho. Por ter me ensinado tanto, mesmo tendo pouco tempo disponível.

Ao colega da Endodontia, Fernando Portella, pelo companheirismo e pela convivência agradável durante todo esse tempo; pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis; pelo exemplo de perseverança em meio às adversidades.

Às amigas Fernanda Porto e Thalita Santa Rosa, pela amizade e apoio; por compartilharmos não só tristezas e decepções, mas as alegrias e as vitórias durante esta jornada. Muito obrigada pelo carinho de vocês e por não me deixarem desanimar nunca.

Aos colegas de Mestrado: Alfonso, pelo seu constante bom humor; ao Luiz Otávio, pela alegria e carinho sempre; à Luciana Abou-id, pela confiança; ao Tiago, Alessandra e Maria Auxiliadora, pela convivência agradável; à Soraia, por sua gentileza e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos: Aline, Ana Carolina (Calu), Cris, Danielle, Flávia, Flaviano, Flávio, Simone, e Prof^a. Sylvia; pelo convívio agradável, pela companhia alegre, e pelo auxílio na condução deste trabalho.

Ao Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas, em especial ao Jamil Silvano Oliveira, pela alegria constante e pela disponibilidade, mesmo sendo tão requisitado; pela ajuda importante neste trabalho.

À Maria Gorete Barbosa Ribas, pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho, atenção e disponibilidade sempre. Por me acolher como “filha”.

Aos colegas Arnaud Bezerra, Cristiano e Tânia, pelo apoio e incentivo.

À Norma Lira, por ter contribuído de maneira significativa nesta empreitada.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Faculdade de Odontologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Microbiologia, pela oportunidade fornecida à realização deste trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG, pela atenção e ajuda prestadas.

À Sara, Wanessa, Beth e Janete, pela atenção e presteza sempre que requisitadas no Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia - UFMG.

À CAPES, pelo auxílio financeiro durante todo o curso.

A todos que de alguma maneira foram importantes na execução deste trabalho,

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
Vias de acesso dos microrganismos ao Sistema de	
Canais Radiculares.....	21
Microbiota do Sistema de Canais Radiculares.....	23
Ecologia da microbiota endodôntica.....	30
Interações bacterianas.....	33
2.2.3 Substâncias antagonistas.....	38
2.2.3.1 Ácidos Orgânicos.....	38
2.2.3.2 Substâncias antagonistas de natureza não proteica...38	
2.2.3.3 Bacteriocinas.....	39
2.2.4 Atividade antagonista e condições de cultivo.....	41
Gênero <i>Clostridium</i>	42
<i>Clostridium butyricum</i>	43
3. OBJETIVOS.....	46
Objetivo geral.....	46
Objetivos específicos.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
Amostras bacterianas.....	48
Preservação das amostras.....	49
Determinação qualitativa da produção de	
substâncias antagonistas.....	49
Preparo do extrato bruto.....	50

Caracterização da natureza química da substância Antagonista	51
Pesquisa de bacteriófagos líticos.....	51
Avaliação da inibição do crescimento	
pela presença de ácidos.....	51
Estabilidade da atividade antagonista a variações	
de temperatura.....	52
Estabilidade da atividade antagonista a variações de pH.....	53
Susceptibilidade da substância antagonista à ação	
de enzimas proteolíticas.....	53
5. RESULTADOS.....	55
Determinação qualitativa da produção de	
substância antagonista.....	55
Caracterização da natureza química da	
substância antagonista.....	56
Pesquisa de bacteriófagos líticos.....	56
Avaliação da inibição do crescimento pela presença de	
ácidos.....	56
Estabilidade da atividade antagonista a variações de	
temperatura.....	57
5.2.4 Estabilidade da substância antagonista a variações de	
pH.....	58
Estabilidade da substância antagonista á ação de enzimas	
proteolíticas.....	60
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	69

8. ABSTRACT.....	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

BAPPN – *Bacteroides* produtores de pigmentos negros.

BHI – S – *Brain heart infusion* suplementado.

EBV – Vírus Epstein- Barr.

HCMV – Citomegalovírus humano.

MRS – Mann, Rogosa and Sharpe.

PCR - *Polymerase chain reaction*.

RCM – Reinforced clostridial media

SCR – Sistema de canais radiculares.

SDS - PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis - Sodium dodecyl sulphate*.

µL – microlitros.

µm – micrometros.

mL – mililitro.

pH – potencial hidrogeniônico.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Determinação qualitativa da produção de substâncias antagonistas
Teste de Antagonismo *in vitro*.....54
- Tabela 2** - Estabilidade da substância antagonista a variações de
temperatura.....56
- Tabela 3** - Susceptibilidade da substância antagonista á ação de enzimas
proteolíticas – Ação das enzimas tripsina, quimiotripsina e papaína
sobre a atividade antagonista de *Clostridium butyricum*..... 59

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** – Influência do pH na produção de substância antagonista,
utilizando-se como reveladora *Bifidobacterium adolescentis*.....57
- GRÁFICO 2** – Influência do pH na produção de substância antagonista,
utilizando-se como reveladora *Fusobacterium nucleatum*.....58

RESUMO

A microbiota oral é constituída por aproximadamente 500 espécies bacterianas, sendo que em uma dada infecção endodôntica apenas cerca de 1 a 12 espécies são ali recuperadas. Fatores como as interações bacterianas, substâncias antagonistas e bacteriocinas podem influenciar o crescimento bacteriano naquele sitio. Neste estudo, foram avaliadas, *in vitro*, as interações bacterianas que ocorrem entre microrganismos recuperados de infecções endodônticas humanas. Para tal, utilizou-se a técnica de difusão em ágar, mediante uso de diferentes meios de cultura: BHI-S, MRS e AC. Caracterizou-se também, parcialmente, a substância antagonista produzida pelo *C. butyricum*. As espécies bacterianas selecionadas foram: *B. adolescentis*, *Gemella morbillorum*, *C. butyricum*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *L. acidophilus*, *P.intermedia/nigrescens*.. O sinergismo não foi observado entre as espécies selecionadas, porém, o antagonismo foi detectado entre as seguintes interações: *G.morbilloorum contra L. acidophilus*, *P. intermedia/nigrescens. B. adolescentis contra G.morbilloorum*, *C. butyricum*, *F. nucleatum*, *P. intermedia/nigrescens*, *P. micros*. *C. butyricum contra B. adolescentis*, *G. morbillorum*, *F. nucleatum*, *P.intermedia/nigrescens*. *F. nucleatum contra B. adolescentis*, *C. butyricum*, *P. micros*. *P. micros contra B. adolescentis*, *C. butyricum*, *P. intermedia/nigrescens*, *L. acidophillus*. *L. acidophillus contra B. adolescentis*, *F. nucleatum*. *P. intermedia/nigrescens* contra todas as espécies testadas. Não se detectou a presença de bacteriófagos nas zonas de inibição. Pôde-se observar que o tipo de meio de cultura utilizado interferiu nos resultados: o meio AC, quando concentrado, mostrou melhores resultados que

o BHI-S. Finalmente, os resultados relativos à caracterização parcial da substância produzida pelo *C. butyricum* mostraram que ela é estável numa faixa de pH entre 3,5 e 6,5 e em temperaturas de 60°, 70° e 100°C, sendo insensível a ação das enzimas proteolíticas: tripsina, quimiotripsina e papaína, demonstrando que se trata de substância antagonista termo-resistente e de natureza não protéica. Os resultados confirmam dados da literatura, os quais indicam que fatores como pH, meio de cultivo e temperatura interferem na expressão da atividade de substâncias antagonistas, sendo, portanto, importantes determinantes ecológicos na seleção de bactérias no interior do Sistema de Canais Radiculares.

"Entendi que a vida não tece apenas uma teia de perdas, mas nos proporciona uma sucessão de ganhos. O equilíbrio da balança depende muito do que soubermos e quisermos enxergar".

LIA LUFT

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O papel dos microrganismos na indução e perpetuação das alterações pulpoperiapicais foi demonstrado desde o fim do século XIX por W.D.Miller. Aquele pesquisador já alertara que muitas das espécies presentes naqueles sítios não eram cultiváveis (GOMES *et al.*, 1994a). Mais recentemente, estudos realizados tanto em animais quanto em humanos (KAKEHASHI *et al.* 1965; SUNDQVIST, 1976) confirmaram tal premissa.

Das mais de 500 espécies microbianas que colonizam a cavidade oral, apenas um número restrito de 15 a 30 espécies — influenciadas por pressões seletivas naquele meio — têm sido freqüentemente isoladas de canais radiculares infectados (SIQUEIRA Jr. e ROÇAS, 2003). Os principais fatores que influenciam seu crescimento e colonização são: baixa tensão de oxigênio; disponibilidade de nutrientes e interações bacterianas, entre as quais a produção de bacteriocinas pode ser considerada um importante determinante ecológico (SUNDQVIST, 1992b; RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, 1998).

As interações entre as espécies podem ser significativas na colonização do sistema de canais radiculares com polpa necrótica, pelo fato dessa microbiota ser heterogênea. Tais interações podem ser classificadas como positivas ou negativas. São consideradas positivas, aquelas em que o crescimento de uma espécie favorece o crescimento de outra. Por sua vez, quando há inibição do crescimento de outra(s), a interação é dita negativa (GOMES *et al.*, 1994b).

As bacteriocinas são proteínas produzidas por bactérias. Possuem a capacidade de inibir o crescimento de um número limitado de espécies bacterianas que competem pelo mesmo nicho ecológico (SUNDQVIST, 1992b).

Como são raras na literatura as referências às interações bacterianas que se processam em SCR com polpas necróticas, bem como ao papel das bacteriocinas e das substâncias antagonistas produzidas pelos microrganismos naqueles sítios, neste trabalho buscou-se estudar o papel de tais determinantes ecológicos, utilizando-se algumas espécies bacterianas recém-recuperadas de canais radiculares infectados humanos, dando-se ênfase ao estudo da substância antagonista produzida pelo *Clostridium butyricum* detectada *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VIAS DE ACESSO DOS MICRORGANISMOS AO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

A polpa dental e a dentina possuem envoltórios naturais - cimento e esmalte - que as protegem e as isolam da agressão por bactérias e seus subprodutos. O rompimento dessas barreiras favorece a invasão dos túbulos dentinários e, posteriormente, do SCR, por microrganismos da cavidade oral, levando a infecção pulpar e ao desenvolvimento de lesões periapicais (GOMES *et al.*, 1996b; HAAPSALO, 1993; PINHEIRO *et al.*, 2003; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2001a; SUNDQVIST, 1994).

São vários os caminhos pelos quais os microrganismos chegam à polpa dental, sendo as mais comuns: lesões cariosas; fraturas do esmalte e/ou esmalte-dentina; exposição pulpar; forames apicais e canais acessórios; e pela via hematogênica (TRONSTAD, 1992).

Quando há exposição dentinária, seja por perda de esmalte ou cimento, seja por fraturas, há o risco de contaminação pulpar. A permeabilidade da dentina é maior na região próxima à polpa devido ao aumento do diâmetro e da densidade dos túbulos dentinários. Mesmo que as bactérias não atinjam diretamente a polpa, seus subprodutos, como enzimas, toxinas, ácidos graxos, compostos sulfurados e amônia, difundem-se pelo fluido dentinário, alcançando-a (LOPES & SIQUEIRA Jr., 1999).

Segundo KETTERING & TORABINEJAD (1997), as bactérias produtoras de ácido (predominância de Gram-negativo) invadem os túbulos dentinários e desmineralizam suas paredes. Em seguida, espécies proteolíticas atuam sobre a matriz orgânica, alargando os túbulos dentinários e favorecendo a decomposição dos odontoblastos, ao entrar em contato com ácidos e produtos tóxicos, o que facilita a penetração de microrganismos.

A exposição pulpar é outra forma de acesso microbiano ao SCR, sendo a cárie dental sua principal causa. Dependendo da virulência das bactérias, da resistência do hospedeiro, do grau de drenagem do edema e do suprimento sanguíneo, a polpa pode permanecer inflamada por um longo período, ou necrosar rapidamente (LOPES & SIQUEIRA Jr., 1999). Na ausência de um tecido pulpar viável, os microrganismos colonizarão o SCR.

Outra via de infecção do SCR são os forames apicais e os canais acessórios adjacentes às bolsas periodontais, que possibilitam o acesso de microrganismos, ali presentes, ao interior do SCR (KETTERING & TORABINEJAD, 1997).

Segundo estudo realizado por KURIHARA *et al.* (1995), a microbiota presente em dentes com lesões de origem endodôntica e periodontal, é mais complexa que a encontrada em canais radiculares que possuíam apenas envolvimento periapical. Observaram-se, também, diferenças no número de bactérias e morfotipos isolados de canais radiculares e bolsas periodontais. A microbiota presente nas infecções endodônticas era constituída por pequeno número de microrganismos e limitada variedade de espécies, além de que os grupos microbianos predominantes nas bolsas periodontais nem sempre estavam presentes nos canais radiculares.

Outra possível via de contaminação e infecção pulpar é a via hematogênica ou anacorese hematogênica. Na presença de uma bacteremia, microrganismos circulantes podem alcançar canais laterais e forame apical, e colonizar o SCR via corrente sanguínea (TAKAHASHI, 1998).

2.2 MICROBIOTA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

A causa mais comum de infecção e necrose da polpa dental é a destruição dos tecidos dentais, devida à evolução da cárie dental. O tecido pulpar necrótico torna-se ambiente propício aos microrganismos que, direta ou indiretamente, podem causar danos aos tecidos periapicais (SIQUEIRA Jr., 1997).

O papel desempenhado pelos microrganismos na etiopatogenia das alterações pulpo-perirradiculares foi confirmado em 1965, por KAKEHASHI *et al.* Esses pesquisadores compararam as respostas de polpas radiculares de ratos convencionais e de isentos de germes quando expostas à cavidade oral. Observaram necrose pulpar e destruição óssea somente em ratos convencionais – portadores de uma microbiota residente –, enquanto nos animais isentos de germe houve formação de barreira mineralizada e reparo do tecido pulpar. Concluiu-se que a presença ou a ausência da microbiota é fator determinante na evolução da condição pulpar.

Em meados da década de 70, com o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas de isolamento e cultivo de anaeróbios estritos, aumentou-se o interesse sobre o papel de tais microrganismos na patogênese das infecções

endodônticas. SUNDQVIST (1976), utilizando técnicas de isolamento e cultivo em condições de anaerobiose, avaliou 32 dentes com necrose pulpar e coroas intactas: 19 dentes apresentavam destruição óssea periapical e 90% dos microrganismos isolados eram bactérias anaeróbias.

Desde então, a identificação desses microrganismos tem sido feita utilizando-se métodos bioquímicos e fisiológicos. Esses métodos têm demonstrado que as infecções endodônticas são polimicrobianas e, principalmente, constituídas por bactérias anaeróbias Gram-positivo e Gram-negativo, sendo as espécies Gram-negativo, recuperadas de lesões periapicais, as mais freqüentemente envolvidas nas infecções agudas (DAHLÉN, 2002; SUNDQVIST, 1994).

Embora vários estudos (DRUCKER *et al.*, 1992; GOMES *et al.* 1994b; SUNDQVIST, 1992a) tenham demonstrado que os gêneros mais freqüentemente isolados de SCR infectados sejam *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Lactobacillus*, FARBER & SELTZER (1988) relatam que os microrganismos recuperados de SCR infectados expostos aos fluidos orais por mais tempo são diferentes daqueles que o foram por menos tempo. A microbiota de canais radiculares expostos à cavidade oral corresponde, geralmente, à mesma microbiota ali presente. Já em dentes com a câmara pulpar intacta, mas com necrose pulpar, as espécies microbianas recuperadas são predominantemente anaeróbias e em número restrito.

A composição da microbiota de SCR infectados pode variar dependendo do tipo de infecção endodôntica e da lesão perirradicular. As infecções endodônticas são classificadas de acordo com as diferentes condições clínicas,

e se dividem em primárias e secundárias. As primeiras são causadas por microrganismos que colonizam o tecido pulpar necrótico. Já as secundárias são causadas por microrganismos que não estavam presentes em infecções primárias, mas que alcançaram o SCR durante as sessões ou depois de concluído o tratamento endodôntico. Geralmente, a microbiota associada com infecções secundárias é composta por uma única espécie ou por um pequeno número de espécies, quando comparada às primárias. Têm o predomínio de bactérias Gram-positivo, em proporções praticamente iguais de anaeróbios e facultativos. Em tais infecções secundárias, os fungos podem ser encontrados em proporção maior que nas primárias (MOLANDER *et al.*, 1998; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2002b; PINHEIRO *et al.*, 2003).

HAAPSALO (1989) analisou a microbiota de 62 canais radiculares. Com exceção de uma, cujo canal era monoinfectado por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, todas as infecções eram mistas, com predomínio de bactérias anaeróbias. As espécies do gênero *Bacteroides* foram as mais freqüentemente isoladas, com predomínio de *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella denticola*, *Prevotella oris*, *Prevotella oralis* e *Porphyromonas gingivalis*.

Enterococcus faecalis é um microrganismo anaeróbio facultativo que não está normalmente presente em infecções primárias de origem endodôntica, estando, contudo, associado a lesões periapicais persistentes, indicando falhas no tratamento endodôntico (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003). LANA *et al.* (2001) recuperaram essa espécie em uma única amostra examinada e relatam que o microrganismo foi eliminado após o tratamento endodôntico. SIQUEIRA Jr. *et al.*, (2002a), por sua vez,

encontraram uma baixa incidência da espécie. Em seu estudo, dos 53 dentes analisados, *E. faecalis* estava presente em 3 casos assintomáticos e em 1 dente com abscesso. Segundo estes últimos autores, teoricamente a presença da bactéria em infecções primárias poderia pôr em risco o sucesso da terapia endodôntica.

Os bastonetes produtores de Pigmento Negro (BAPPN) são encontrados em 30% (podendo este número variar) dos SCRs infectados, existindo evidências de que tais microrganismos estão relacionados com o desenvolvimento de abscessos apicais (SUNDQVIST *et al.*, 1989). *Prevotella intermedia* (antes denominada *B. intermedius*) tem sido o BAPPN isolado com maior frequência de infecções de origem endodôntica (BAUMGARTNER & FALKLER, 1991). No entanto, BAE *et al.* (1997) avaliaram a ocorrência de *P. intermedia* e *P. nigrescens* em SCRs infectados, utilizando SDS-PAGE para diferenciar as duas espécies. Concluíram que, das 56 amostras analisadas, 41 (73,2%) foram identificadas como *P. nigrescens* e somente 15 (26,8%) como *P. intermedia*, indicando que *P. nigrescens* é a espécie, dentre os BAPPNs, mais frequentemente isolada de infecções de origem endodôntica.

Os gêneros bacterianos detectados por LANA *et al.*, (2001) em infecções endodônticas humanas foram semelhantes aos encontrados na literatura. Os pesquisadores observaram que os gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* foram, dentre os anaeróbios, os encontrados com maior frequência. Nos 31 dentes avaliados, observaram que somente em 2 canais radiculares foram isoladas as leveduras *Cândida* e *Saccharomyces*.

Estudando a microbiota de infecções endodônticas primárias e secundárias, GOMES *et al.*, (2004) isolaram e identificaram 224 amostras de 60 canais

radiculares. Desses, 41 apresentavam polpa necrótica e 19 eram de dentes que já haviam sido tratados endodonticamente por mais de 4 anos e apresentavam evidências radiográficas de periodontite apical. Das espécies isoladas, 70% eram anaeróbios ou microaerófilos. Os anaeróbios mais freqüentemente isolados foram: *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *P. intermedia/nigrescens* (16,7%), *Porphyromonas gingivalis* (6,7%) e *Porphyromonas endodontalis* (5%). A microbiota dos canais não tratados era mista, composta de bactérias anaeróbias Gram-positivo e Gram-negativo e, geralmente, continham mais de 3 espécies por canal. Anaeróbios facultativos e microrganismos Gram-positivo predominavam em canais que já haviam sido tratados, com uma média de 2 espécies recuperadas por canal, sugerindo que a microbiota de infecções primárias com periodontite apical difere em número e espécie, quando comparada àquela das infecções secundárias.

PINHEIRO *et al.*, (2003) identificaram a microbiota de 60 dentes que apresentavam falhas no tratamento endodôntico, com evidências radiográficas de periodontite apical e sintomas e/ou desconfortos persistentes pós-tratamento. Microrganismos foram isolados de 51 dentes, sendo que, na maioria dos casos, uma ou duas amostras foram encontradas. Das espécies isoladas, 57,4% eram anaeróbios facultativos, sendo 83,3% Gram-positivo. *E. faecalis* foi a espécie mais freqüentemente isolada. Os anaeróbios estritos correspondiam a 42,6% das espécies isoladas, sendo *Peptostreptococcus* o gênero mais isolado. Estima-se que menos de 20% das espécies presentes em infecções endodônticas são cultiváveis, o que sugere que um grande

número de bactérias não são identificadas pelos métodos convencionais (ROLPH *et al.*, 2001).

Até a última década, a metodologia utilizada para a recuperação de microrganismos presentes nos SCRs era somente por intermédio de culturas. As limitações de tal técnica residem no fato de que muitas bactérias não são cultiváveis; outras são de difícil crescimento (PITT & SAUNDERS, 2000).

Esse método convencional continua sendo importante no diagnóstico de doenças infecciosas. Mas, recentemente, métodos moleculares vêm sendo utilizados em pesquisas e diagnósticos, acrescentando informações significativas sobre a microbiota das infecções humanas. Tais inovações têm sugerido também que algumas espécies bacterianas anaeróbias são mais prevalentes em infecções endodônticas do que se imaginava quando da utilização apenas de cultura microbiológica (SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2001a, 2002a).

Como exemplo de espécies microbianas que não haviam sido isoladas de infecções de canais radiculares anteriormente, mas que foram detectadas recentemente pelos métodos moleculares, pode-se mencionar: *B. forsythus*, *Prevotella tanneriae* e *Treponema denticola* (JUNG *et al.*, 2000; RÔÇAS *et al.*, 2001).

Outras espécies bacterianas de difícil crescimento como *P. endodontalis*, *Slackia exígua*, *Mogibacterium tinidum* e *Eubacterium saphenum* foram detectadas em altas prevalências quando utilizando métodos moleculares (SIQUEIRA JR. *et al.*, 2001a).

O cultivo de espiroquetas é bastante difícil devido a sua exigência nutricional, além de que algumas espécies requerem condições de anaerobiose estrita para seu crescimento. Utilizando “nested” PCR para determinar a prevalência de espiroquetas em canais infectados associados a abscessos, BAUMGARTNER *et al.*(2003) detectaram as seguintes espécies: *Treponema vicentii*, *Treponema pectinovorum*, *Treponema medium*, *Treponema amylovorum*, *Treponema denticola*, *Treponema maltophilum* e *Treponema socranskii*.

Alguns tipos de patologias periapicais graves se desenvolvem como resultado de interações entre vírus herpético e bactérias e, conseqüentemente, de reações imunológicas que se processam no hospedeiro. SABETI *et al.*(2003), utilizando PCR, detectaram a presença de Citomegalovírus (HCMV) e Epstein-Barr (EBV) em lesões endodônticas sintomáticas. Das 14 lesões periapicais estudadas, o HCMV foi detectado em 13 lesões e o EBV foi identificado em 8. A única lesão periapical assintomática estudada continha HCMV e não EBV.

SLOTS *et al.* (2004), utilizando métodos moleculares, estudaram a ocorrência HCMV e EBV em lesões periapicais. Concluíram que ambos ocorriam mais freqüentemente em lesões periapicais sintomáticas que nas assintomáticas.

A ocorrência de fungos nas infecções dos SCR tem sido identificada através de metodologia utilizando meios de cultura, métodos moleculares e microscopia eletrônica “in situ” O gênero *Candida* representa o isolado mais freqüente, sendo a *Candida albicans* a espécie mais freqüentemente

encontrada (LANA *et al.*, 2001; MOLANDER *et al.*, 1998; SIQUEIRA Jr *et al.*, 2002c; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003).

SIQUEIRA Jr. *et al.* (2004), também por métodos moleculares, detectaram microrganismos localizados no terço apical de canais radiculares infectados. Foram analisados 23 dentes extraídos, que apresentavam exposição pulpar por cárie e lesão perirradicular. Verificaram a presença de 11 espécies bacterianas, através de “nested” PCR. *Pseudomonas aeruginosa* ocorria em 10 casos (44%), *Treponema denticola* em 6 (26%), *F. nucleatum* em 6 (26%), *P. endodontalis* em 4 (17%), *Filifactor alocis* em 2 (9%), *Dialister pneumosintes* em 1 (4%), *P. gingivalis* em 1 (4%), e *Tannerella forsythensis* em 1 (4%). *P. intermedia/nigrescens* e *Campylobacter rectus* não foram detectados na amostragem.

A utilização de tais métodos moleculares, portanto, tem acrescentado informações importantes na identificação de microrganismos causadores de infecções endodônticas, permitindo assim o desenvolvimento de técnicas e estratégias que favorecem o sucesso do tratamento endodôntico (SIQUEIRA Jr., 2002b).

2.2.1 – ECOLOGIA DA MICROBIOTA ENDODÔNTICA

Teoricamente, qualquer bactéria presente na cavidade oral pode invadir o Sistema de Canais Radiculares. Mais de 500 espécies bacterianas estão ali presentes, mas somente um pequeno número delas – quinze a trinta – coloniza o SCR. O fenômeno se justifica pelo fato de as pressões seletivas ocorrerem

no interior do sistema, favorecendo o crescimento de algumas espécies e inibindo o de outras (JUNG *et al.*, 2000; SUNDQVIST, 1994; SIQUEIRA Jr., 2002).

Fatores abióticos e bióticos podem influenciar o crescimento bacteriano e sua colonização em SCR infectados. A disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio (potencial redox), a temperatura e o pH, fatores presentes em SCRs com polpas necróticas, são considerados abióticos. Como fator biótico, temos as interações bacterianas cooperativas (sinergismo) ou competitivas (antagonismo) (SUNDQVIST, 1992b; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2002b).

A disponibilidade de nutrientes é fator muito importante para o estabelecimento da microbiota no SCR. A fonte de nutrientes pode ser o tecido pulpar desintegrado e/ou os fluidos tissulares. As bactérias sacarolíticas podem obter energia pela fermentação de carboidratos e, como no interior do SCR há deficiência desses nutrientes, tais microrganismos possuem menor chance de crescimento — é o caso, por exemplo, de *Streptococcus mutans* (GOMES *et al.*, 1994b). Muitos microrganismos (bactérias assacarolíticas) podem utilizar aminoácidos e peptídeos como fonte de energia, sendo aptas a se multiplicarem no interior do SCR (SUNDQVIST, 1994; GOMES *et al.*, 1994b). Ademais, muitas bactérias podem utilizar produtos de outras espécies bacterianas como fonte de energia (GRENIER & MAYRAND, 1986), além de que os microrganismos que colonizam o terço apical do SCR obtêm nutrientes (vitaminas, hormônios e componentes do sangue) diretamente do hospedeiro (SIQUEIRA *et al.*, 2004).

Fatores inibitórios produzidos por outras bactérias ou a competição por nutrientes podem influenciar a microbiota. Tais fatores podem ser simples

metabólitos ou substâncias de natureza protéica tipo-bacteriocina (ZERR et al., 1998). Nesse aspecto, *P. micros* tem importante papel no ecossistema pelo fato de apresentar forte atividade enzimática proteolítica, que fornece aminoácidos e peptídeos para serem utilizados em seu próprio metabolismo e no metabolismo de outras espécies. Já foi demonstrado que esse microrganismo aumenta a patogenicidade de outras bactérias (SIQUEIRA Jr. et al., 2003a).

Os BAPPNs (*Prevotella* e *Porphyromonas*) requerem vitamina K e hemina como nutrientes. A vitamina K pode ser produzida por outras bactérias e a hemina pode ser obtida tanto da quebra da hemoglobina, quanto pode ser produzida por outras espécies. *Porphyromonas*, por exemplo, pode ter seu crescimento estimulado pela hemina, fator importante para seu desenvolvimento, produzida por *C. rectus* (GRENIER & MAYRAND, 1986). Por outro lado, *C. rectus* requer para seu crescimento o formato, que pode ser produzido por *P. endodontalis*, *P. micros*, *Selenomonas sputigena*, *F. nucleatum* e *Actinomyces sp* (SIQUEIRA Jr. & RÔÇAS, 2003a).

O baixo potencial de oxi-redução - que favorece o crescimento de bactérias anaeróbias, principalmente no terço apical - e as interações bacterianas são, talvez, os mais importantes determinantes ecológicos nos SCRs infectados. Em tais infecções, a redução no número de bactérias facultativas e o aumento proporcional de bactérias anaeróbias, com o passar do tempo, podem ser ocasionados pelo consumo de oxigênio e pela instalação de um ambiente de baixa tensão de oxigênio (SUNDQVIST, 1994; GOMES et al., 1994b).

O pH normal dos tecidos varia entre 7,2 e 7,4. Em tecido acometido por processo infeccioso, o pH torna-se ácido, caindo para uma faixa que varia de 6,5 a 6,8, podendo chegar a 5, em condições extremas. O pH pode também

assumir um valor de neutralidade, quando um processo infeccioso crônico se instala, ou ficar levemente alcalino. O pH no interior do SCR portador de necrose pulpar pode variar entre 6 e 7,4, condição na qual a maioria das bactérias pode sobreviver. Espécies acidúricas podem inclusive sobreviver em pH muito ácido (LOPES & SIQUEIRA Jr., 1999).

As associações microbianas têm papel importante na regulação da composição da flora subgengival (SOCRANSKY *et al.*, 1988) e essas relações também influenciam a microbiota do SCR (FABRICIUS *et al.*, 1982; SUNDQVIST 1992a; GOMES *et al.*, 1994b).

De acordo com SOCRANSKY *et al.* (1988), em uma associação positiva, uma espécie pode favorecer outra, produzindo fatores de crescimento, mudando as condições físico-químicas do ambiente ou providenciando um sítio de ligação para uma segunda espécie. Nas associações negativas, uma espécie pode produzir substâncias que podem ser letais para uma segunda espécie, competir por nutrientes ou pode destruir sítios de ligação de uma segunda espécie.

2.2.2 INTERAÇÕES BACTERIANAS

As interações bacterianas são um dos principais determinantes ecológicos no estabelecimento da microbiota infectante em SCR. A demanda de nutrientes necessários à sobrevivência das bactérias influencia nas interações entre os microrganismos. Os produtos do metabolismo das bactérias são fonte de

nutrientes que podem favorecer determinadas espécies deles dependentes, ou podem ser tóxicos para outras, inibindo seu crescimento (SUNDQVIST, 1992a, b).

Essas interações são classificadas como positivas ou negativas. São exemplos de interações positivas: mutualismo, comensalismo e sinergismo (GOMES *et al.*, 1994a; SIQUEIRA Jr. & ROÇAS., 2003c ; SUNDQVIST, 1992a, b, 1994).

Quando uma espécie é favorecida e a outra não é beneficiada nem agredida, a relação é definida como comensalismo (GHARBIA & SAHAH, 1993).

As interações de sinergismo compreendem aquelas em que o metabolismo de uma espécie fornece nutrientes necessários para o crescimento de membros de outra. Entre esses produtos estão compostos como vitamina K, CO₂, H₂, NH₄ (SUNDQVIST, 1992 a, b, 1994). Em 1992, SUNDQVIST observou que *Fusobacterium nucleatum* era a espécie isolada com mais frequência de SCRs infectados, e se associava positivamente com *P. micros*, *W. recta*, *P. endodontalis* e *S. sputigena* e *C. rectus*. *B. intermedius* foi isolado em 34% dos casos, e estava associado positivamente com *P. anaerobius*, *P. micros* e *Eubacterium* sp. Havia ainda uma forte associação positiva entre *Eubacterium alactolyticum* e *P. anaerobius*.

FABRICIUS *et al.* (1982), em estudo em macacos, observaram a habilidade de 11 amostras bacterianas, em várias combinações, em induzirem destruição óssea periapical. *B. oralis*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *S. milleri*, *S. faecalis*, *P. anaerobius*, *A. bovis* e *Propionibacterium acnes*, quando combinados,

produziram lesões periapicais maiores que 1mm em 11 dos 12 dentes examinados.

SIQUEIRA Jr & ROÇAS (2003a), através da técnica de PCR, detectaram *P. micros* em infecções primárias de SCR. Segundo os autores, tal espécie tem papel importante naquele ecossistema, por causa de sua atividade enzimática proteolítica, fornecendo aminoácidos e peptídeos utilizados no metabolismo de outras bactérias. Confirmando os achados de SUNDQVIST (1992 b), foi detectado que *P. micros* estava associado positivamente com *P. endodontalis* e *T. denticola*, *F. nucleatum*, *Prevotella* spp e *Eubacterium* spp.

Estudando a associação entre sinais e sintomas de origem endodôntica, com combinações de bactérias específicas em uma amostra de 70 canais, GOMES *et al.* (1996) verificaram que as seguintes espécies representavam 64% das isoladas: *P. micros*, *P. melaninogenica*, *P. oralis*, *E. aerofaciens*, *E. lentum*, *F. nucleatum*, *Prevotella buccae* e *P. intermedia*. Associações entre sinais clínicos e pares de espécies específicas foram assim relacionadas: (a) Dor (37 casos) – *Peptostreptococcus* spp. / *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. / *P. melaninogenica*, *P. micros* / *P. melaninogenica*; (b) edema (23 casos) – *P. micros* / *Prevotella* spp.; (c) canal com exsudato (57 casos) – *Prevotella* spp. / *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. / *Eubacterium* spp.

HAAPSALO (1989), em estudo sobre os anaeróbios produtores de pigmentos negros, associou a presença de *Porphyromonas endodontalis* e *P. gingivalis* com infecções endodônticas agudas.

Em 2001, LANA *et al.* observaram fortes associações positivas entre os gêneros *Clostridium* e *Peptostreptococcus*; *Prevotella* e *Fusobacterium*.

Associações positivas, mas um pouco fracas, ocorriam entre *Prevotella* e *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus*.

O “red complex”, composto de *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, foi pesquisado por RÔÇAS *et al.* (2001). Esse conjunto de bactérias está associado à severidade da doença periodontal e o objetivo dos autores foi verificar, utilizando PCR, sua ocorrência em infecções endodônticas. Um total de 50 dentes apresentando polpa necrótica e patologia perirradicular foi analisado. *B. forsythus* e *P. gingivalis* foram encontrados associados positivamente, em 9 dos 50 dentes analisados, indicando uma associação positiva entre as 2 espécies.

JUNG *et al.* (2000) utilizaram como metodologia PCR e hibridização “dot-blot” para observar a correlação entre epidemiologia dos microrganismos no SCR, sinais e sintomas clínicos relacionados às periodontites apicais e para determinar as associações entre os patógenos. As espécies mais freqüentemente encontradas foram: *Fusobacterium* sp. (68,4%), *P. micros* (44,7%) e *P. gingivalis* (26,3%). Bactérias Produtoras de Pigmentos Negros (BPPNs) estavam presentes em 42,1% dos dentes analisados. *B. forsythus* e *Treponema* sp. foram detectados em 8 e 6 dentes respectivamente, do total de 40 dentes analisados. Sobre as associações microbianas, as seguintes foram encontradas: *P. gingivalis* e *T. denticola*; *P. gingivalis* e *B. forsythus*. E apesar de não ter sido considerada como estatisticamente significativa, *Fusobacterium* sp. foi detectado associado positivamente com muitas outras bactérias, como *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *B. forsythus*, com exceção de um caso. Quanto aos sinais e sintomas, não foram encontradas associações significativas.

Utilizando PCR, SIQUEIRA Jr. & RÔÇAS (2003a) detectaram *C. rectus* em 25% de 65 canais radiculares infectados. As espécies estavam positivamente associadas com *P. endodontalis*, *P. micros*, *S. sputigena*, *F. nucleatum*, *Actinomyces* sp. e *Eubacterium* sp.

BAUMGARTNER *et al.* (2003) identificaram espiroquetas (Treponemas) em infecções endodônticas e encontraram associações significantes entre *T. maltophilum* e *T. socranskii*, como também entre *T. maltophilum* e *T. denticola*.

Em estudo muito recente, GOMES *et al.* (2004) fizeram um estudo microbiológico de 60 canais radiculares infectados, sendo que 41 possuíam polpa necrótica (infecção primária) e 19 possuíam falhas no tratamento endodôntico (infecção secundária). A finalidade do estudo era verificar a correlação entre sinais e sintomas clínicos e bactérias específicas. Das bactérias isoladas, 70% eram anaeróbios estritos e *P. micros* foi a espécie mais prevalente (35%), seguido de *F. necrophorum* (23,3%), *F. nucleatum* (11,7%), *P. intermedia/nigrescens* (16,7%), *P. gingivalis* (6,7%) e *P. endodontalis* (5%). As associações encontradas foram: a) Dor – *P. micros*, *P. intermedia/nigrescens* e *Eubacterium* spp.; b) história de dor – *P. micros*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* spp.; c) sensibilidade à percussão – *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* spp.; d) edema – *Peptostreptococcus* spp., *Porphyromonas* e *Enterococcus* spp.; e) presença de exsudato purulento – *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* spp.; f) exsudato - *Porphyromonas* e *Fusobacterium* spp.

Paralelamente, no ambiente endodôntico ocorrem interações negativas. Essas podem ser classificadas como competição ou antagonismo. A disputa por nutrientes entre duas ou mais espécies é denominada competição. Essa

condição ocorre quando duas espécies ocupam o mesmo nicho, e lutam pela obtenção de nutrientes essenciais para sua sobrevivência. Antagonismo está relacionado com a produção por um microrganismo de substâncias que exercem função bactericida ou bacteriostática em outro organismo presente no mesmo hábitat ou alterando as condições do ambiente, através de fatores como pH ou potencial de oxi-redução, tornando-o desfavorável a outras espécies (MAYRAND & GRENIER, 1998).

SUNDQVIST (1992 a, 1994) mostrou que, em geral, espécies de *Streptococcus*, *Propionibacterium propionicus*, *Capnocytophaga ochracea* e *Veillonella parvula*, revelaram antagonismo ou nenhuma associação com outras bactérias. Foi observada também interação negativa entre *P. endodontalis* e *P. intermedia*.

Estudando as interações envolvendo *D. pneumosintes* em infecções endodônticas primárias, SIQUEIRA Jr. & ROÇAS (2003b) relatam associações negativas entre aquela bactéria e *Bacteroides forsythus*, *P. gingivalis* e *Actinomyces israelii*.

Avaliando a influência da produção de substâncias antagonistas na colonização do SCR, RIBEIRO SOBRINHO *et al.* (2001) mostraram um alto antagonismo entre *G. morbillorum* e *B. adolescentis*, *C. butyricum* e *F. nucleatum*. *B. adolescentis* inibia o crescimento de *F. nucleatum*. *F. nucleatum* mostrava auto-antagonismo e inibia o crescimento de *G. morbillorum*. Relataram ainda que *C. butyricum* não produzia substância antagonista contra nenhuma das bactérias testadas.

2.2.3 SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS

As substâncias antagonistas podem ser classificadas em substâncias de natureza proteica, não-proteica, ácidos orgânicos (ácido acético, lático ou outros ácidos específicos) e peróxido de hidrogênio (PIARD & DESMAZEAUD, 1991).

2.2.3.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS

A atividade antimicrobiana dos ácidos lático e acético é, em parte, devido ao fato de que estes ácidos na forma não dissociada podem atravessar a membrana celular microbiana reduzindo o pH intracelular, que irá interferir com importantes funções metabólicas (NAIDU *et al.*, 1999).

O ácido acético possui um efeito inibitório mais acentuado, uma vez que sua constante de dissociação é maior que a do ácido lático (PIARD & DESMAZEAUD, 1991).

2.2.3.2 SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS DE NATUREZA NÃO PROTEICA

Os compostos de natureza não-proteica já descritos na literatura, possuem as seguintes características: pequeno tamanho (massa molecular menor que 1 KDa), estrutura química heterocíclica ou aromática, e amplo espectro de ação antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (NIKU-PAAVOLA *et al.*, 1999).

As seguintes substâncias são descritas na literatura como sendo de natureza não proteica: reuterina (produzida por *L. reuteri*), metilhidatoína, acetaldeído e D.isômeros de aminoácidos (NIKU-PAAVOLA *et al.*, 1999).

2.2.3.3 BACTERIOCINAS

É possível que as bacteriocinas possam influenciar a ecologia microbiana do SCR, inibindo o crescimento de algumas espécies que competem pelo mesmo nicho ecológico (SUNDQVIST, 1992b).

PASTEUR & JOUBERT (1877) foram os primeiros pesquisadores que observaram interações antagonistas entre bactérias. Eles verificaram que uma cepa de *E. coli* presente na urina exercia efeito inibitório sobre o *Bacillus anthracis* (JACK *et al.*, 1995). Contudo, o primeiro estudo sobre bacteriocinas foi realizado em 1925, quando GRATIA relatou ter descoberto um antibiótico produzido em meio líquido. A substância era dializável e termo-estável, altamente específica, produzida por *Escherichia coli* e ativa contra outras amostras da mesma espécie. Em 1932, o mesmo autor demonstrou que tais substâncias possuíam natureza protéica, além de verificar que outras amostras de *E. coli* produziam substâncias similares (JACK *et al.*, 1995; DAW & FALKINER, 1996).

Por sua vez, o termo bacteriocina somente foi introduzido por JACOB *et al.*, em 1953. Esses pesquisadores definiram as bacteriocinas como proteínas antibacterianas, caracterizadas pela biosíntese letal e ativa, contra linhagens da mesma espécie, ligando-se a receptores específicos na superfície de células bacterianas (JACK *et al.*, 1995).

A família das bacteriocinas é composta por uma diversidade de proteínas, que variam em tamanho, modo de ação, mecanismos de imunidade e alvo microbiano. Existem diferenças entre as bacteriocinas de bactérias Gram-

negativo e Gram-positivo. Bacteriocinas de bactérias Gram-positivo são mais abundantes e possuem maior diversidade que as de bactérias Gram-negativo, e, na grande maioria, são secretadas por “baterias ácido-láticas”. Como exemplos: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* (RILEY & WERTZ, 2002).

Baseados nos estudos das colicinas produzidas por bactérias Gram-negativo, TAGG *et al.* (1976) sugeriram 6 critérios para se caracterizarem tais proteínas. São eles: estreito espectro de atividade inibitória (geralmente com ação bactericida centrada nas espécies homólogas); presença de uma parte protéica; ação bactericida; ligação a receptores específicos; determinantes genéticos plasmidiais de produção de bacteriocina e imunidade da célula hospedeira.

Apesar das bacteriocinas serem definidas como as que possuem um componente protéico ou peptídeo, essenciais à sua função, algumas têm sido descritas por consistirem de combinações de diferentes proteínas, e ainda podem ser compostas de proteínas e moléculas de lipídeos e carboidratos (JACK *et al.*, 1995; DAW & FALKINER, 1996).

Alguns autores preferem usar, para as substâncias incompletamente caracterizadas, o termo "substância tipo-bacteriocina" ou "substância inibitória tipo-bacteriocina". Reservam eles o termo bacteriocina para aquelas substâncias que já foram razoavelmente caracterizadas e que se enquadram nos critérios estabelecidos para tal classificação. As bacteriocinas parecem representar um grupo heterogêneo de moléculas que variam desde peptídeos a partículas de alto peso molecular, de estrutura e composição complexas (JACK *et al.*, 1995; DAW & FALKINER, 1996).

KLAENHAMER (1993) dividiu as bacteriocinas em quatro classes, baseando-se em sua estrutura primária e em seu mecanismo de ação: I) os lantibióticos, que consistem de pequenos peptídeos que apresentam aminoácidos não usuais como lantionina, metil-lantionina, deidrobutirina e deidroalanina; II) pequenos peptídeos termo-estáveis; III) proteínas termo-lábeis; IV) proteínas complexas que, para exercerem sua atividade, associam-se a moléculas de carboidratos ou lipídios.

Em 1976, Clarke e Morris isolaram uma bacteriocina produzida por *Clostridium butyricum*, que foi denominada butyricin 7423. A ação primária dessa bacteriocina ocorre na membrana celular, sendo ativa contra outras espécies de *Clostridium*. É moderadamente estável a altas temperaturas; mantém-se ativa em 50%, depois de tratada a 100°C, por 10 minutos; é completamente inativada pelo tratamento com Tripsina (CLARKE & MORRIS, 1976).

2.2.4 ATIVIDADE ANTAGONISTA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A expressão da atividade antagonista bacteriana é influenciada pelos nutrientes do meio de cultura, pelas condições de cultivo, temperatura de incubação e pH. Pode também ser influenciada pelas diferentes fases de crescimento do microrganismo produtor da bacteriocina (TAGG *et al.*, 1976; GOMEZ *et al.*, 1997; MAHONY *et al.*, 1978). Não há um consenso na literatura quanto ao assunto, e aparentemente cada espécie bacteriana necessita de nutrientes específicos para a expressão dessa atividade. A atividade

antagonista é melhor visualizada em meios de cultura ricos, mas a espécie bacteriana a ser estudada pode exibir requerimentos nutricionais específicos para expressar diferentes bacteriocinas ou substâncias tipo-bacteriocina (FARIAS *et al.*, 1992; RILEY, 1998).

No que diz respeito aos efeitos dos meios de cultura sobre a produção de substâncias bacteriocinogênicas, CARVALHO (2002) relata que o meio mais favorável à produção de substância antagonista por *S. aureus* é o meio BHI, pH 7,0, no qual os halos de inibição apresentam-se maiores e mais nítidos. OLIVEIRA (1997) observou que o *Fusobacterium* tem uma melhor expressão da atividade bacteriocinogênica em meio BHI-S. Por sua vez, RODRIGUES (2001) demonstrou que amostras de BAPPN produziram substâncias antagonísticas contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, em todos os meios de cultivo testados.

Segundo a literatura pesquisada, os seguintes meios foram utilizados para o cultivo de *Clostridium*: RCM (reinforced clostridial medium) (CLARKE *et al.*, 1976; KEMPERMAN *et al.*, 2003; THUAULT *et al.*, 1991); AC, que, segundo KEMPERMAN *et al.*(2003), é específico para a produção de bacteriocinas; BHI, utilizado por MAHONY *et al.* (1978) em estudos específicos sobre bacteriocinas produzidas por *Clostridium perfringens*.

2.3 GÊNERO CLOSTRIDIUM

Os clostrídios são bastonetes Gram-negativo, anaeróbios, esporulados e móveis. Muitas espécies são conhecidas como patógenos. Algumas

decompõem proteínas ou formam toxinas; outras realizam os dois processos. Entre os patógenos, estão os microrganismos responsáveis por botulismo, tétano, gangrena gasosa e colite pseudomembranosa (JAWETZ *et al.*, 2000).

Dividem-se em cerca de 85 espécies, sendo que 20 são importantes patógenos humanos (HOLT *et al.*, 1994; NISENGARD, 1997). A maioria das espécies é anaeróbia estrita, e algumas podem crescer, mas não esporulam na presença de oxigênio. Poucas espécies são Gram-negativo, podendo apresentar gramabilidade (Gram-positivo torna-se Gram-negativo). A forma e a localização dos esporos auxiliam sua diferenciação, além das provas bioquímicas. Quanto à localização, eles podem estar situados na porção central, subterminal ou terminal das células.

Os clostrídios estão amplamente distribuídos na natureza, mas é de origem endógena a maioria das doenças em humanos, com exceção das intoxicações alimentares causadas por *C. perfringens*, tétano (*C. tetanii*) e botulismo (*C. botulinum*), além dos casos de colite causada por *C. difficile* (NISENGARD, 1997).

Para a maioria das espécies, o crescimento se dá numa temperatura entre 30 e 37^oC, numa faixa de pH que varia entre 4.6 e 5.0, sendo o crescimento mais rápido numa faixa de pH entre 6.5 e 7.0 (HOLT *et al.* 1994).

2.3.1 CLOSTRIDIUM BUTYRICUM

São bactérias que possuem tamanho médio entre 0.5-1.7x 2.4-7.6 µm; podem apresentar-se sozinhos, em pares e, ocasionalmente, como longos

filamentos. Seus esporos são ovais, podendo se localizar no centro ou na porção subterminal da célula.

Apresentam crescimento ótimo numa faixa de pH entre 4.6 e 5.0, após incubação por 5 dias, sendo a temperatura ideal entre 30 e 37⁰C (algumas amostras podem crescer bem a 25⁰C e outras a 10⁰C). O crescimento pode ser inibido quando adicionado NaCl a 6.5% (MOLONGOSKI, *et al.*, 1976).

Produzem ácido butírico, acético e fórmico; ácido láctico e succínico e, algumas vezes, butanol e etanol (SCHINK *et al.*, 1981; SCHINK & ZEIKUS, 1982).

Sua bacteriocina é ativa contra várias espécies, particularmente de *C. pasteurianum* (CLARKE *et al.*, 1976).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, as interações que ocorrem entre as espécies microbianas prevalentes em necrose de Sistemas de Canais Radiculares humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a ocorrência de sinergismo e/ou antagonismo entre bactérias recuperadas de SCRs infectados.
- ✓ Caracterizar parcialmente a substância antagonista produzida por *Clostridium butyricum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras foram recuperadas no desenvolvimento do trabalho: “Avaliação microbiológica de canais radiculares com necrose pulpar em três etapas do tratamento endodôntico”, de autoria de Márcia Almeida Lana, desenvolvido na Faculdade de Odontologia da UFMG e no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB/UFMG). Neste trabalho foram avaliados 31 dentes com necrose pulpar, em três etapas do tratamento endodôntico: antes de sua manipulação, após o preparo químico-mecânico e a utilização de medicação intra-canal e no momento da obturação. Os espécimes clínicos foram coletados em anaerobiose e cultivados em condições específicas para o isolamento de bactérias anaeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas e leveduras. Os gêneros mais freqüentemente isolados foram: *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* (LANA 1999).

Em nosso trabalho, foram selecionadas 07 amostras bacterianas das recuperadas com maior frequência no trabalho acima citado. Utilizaram-se as seguintes amostras:

Bifidobacterium adolescentis,

Gemella morbillorum,

Clostridium butyricum,

Fusobacterium nucleatum,

Peptostreptococcus micros/prevotii,

Lactobacillus acidophilus,

Prevotella intermedia/nigrescens.

4.2 PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram mantidas em *freezer* a -86° C, no Laboratório da Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, em caldo BHI-S (Difco Laboratories, Sparks, USA) e MRS (Difco Laboratories, Sparks, USA) para *Lactobacillus*, acrescido de 15% de glicerol. Sua recuperação foi feita utilizando-se caldo BHI-S suplementado com extrato de levedura 0,5%, hemina e 10 μ g/ml, menadiona 1 μ g/ml e 0,075% de l - cisteína.

4.3 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS

A produção de substâncias antagonistas foi detectada, utilizando-se a técnica de difusão em ágar (JACK *et al.*, 1995). Cada linhagem foi repicada em caldo BHI-S, com exceção de *Lactobacillus acidophilus*, que foi repicado em caldo MRS (Difco Laboratories, Sparks, USA), e incubado a 37° C, em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Company, Marietta,

USA, atmosfera de N₂ 85%, H₂ 10% e CO₂ 5%), por 24 e 48 horas, dependendo da amostra. Fez-se *spots* de 5 µL na superfície do ágar BHI-S ou do MRS. As placas foram incubadas por um período de 24 a 48 horas, nas mesmas condições anteriormente descritas. Após a incubação, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose, expostas ao vapor de clorofórmio, por 30 minutos, e entreabertas por igual período para evaporação do clorofórmio residual. Fez-se a revelação da presença de substância antagonista, recobrando-se a placa com 3,5 mL de ágar semi-sólido fundido (BHI-S ou MRS 0,75%, de acordo com a espécie reveladora), inoculado com, aproximadamente, 10⁶ a 10⁹ células da espécie reveladora, incubando-se em condições de cultivo específicas para cada uma delas.

Procedeu-se, então, à leitura do experimento, analisando-se a formação de halos de inibição de crescimento em torno dos *spots*. A leitura era feita pela produção de halos de inibição. Os halos foram medidos com um paquímetro digital (Mitutoyo Sul América Ltda). Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.4 PREPARO DO EXTRATO BRUTO

A amostra de *C. butyricum* foi crescida em caldo BHI-S e encubada em anaerobiose por 24 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada (centrífuga RC5C Sorvall Instruments Du Pont) a 4°C, 10.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore Corp. Bedford, USA) e dividido em alíquotas de 15 mL, congelando-se a -70°C. Após

alcançarem tal temperatura, liofilizaram-se as amostras (Free Zone 6 LITER, LABCONCO, USA) no Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas do ICB/UFMG. Ao final do processo de liofilização, ressuspenderam-se as alíquotas em 500 µL de água ultra-pura estéril, concentrando-as 10 vezes em relação ao volume inicial.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA NATUREZA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA

A caracterização foi feita utilizando-se como produtora a amostra de *C. butyricum* e, como reveladoras, *B. adolescentis* e *F. nucleatum*.

4.5.1 PESQUISA DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS (TURNER & JORDAN, 1981)

A fim de avaliar a presença de fagos como possíveis responsáveis pela atividade antagonista, retirou-se, assepticamente, um fragmento de ágar, de 3 mm² de diâmetro, da zona do halo de inibição detectado. O fragmento foi colocado sobre uma placa contendo ágar BHI-S, que foi imediatamente recoberta com ágar BHI-S ou MRS (*B. adolescentis*) semi-sólido, acrescido da quantidade padronizada da bactéria reveladora. Após 48 e 24 horas de incubação, a 37°C, e em anaerobiose, foi avaliada a presença de zonas líticas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PELA PRESENÇA DE ÁCIDOS (FARIAS *et al.*, 1992)

Foram preparadas placas com ágar BHI-S, aferindo-se o pH do meio dentro e fora dos halos de inibição, com o auxílio de um microeletrodo de superfície (Microelectrodes Inc, USA), após a revelação do antagonismo. Utilizou-se como controle as placas sem inóculo. Os valores foram então comparados com aqueles obtidos na placa controle e na placa contendo o inóculo.

4.5.3 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTAGONISTA A VARIAÇÕES DE TEMPERATURA (GOMEZ *et al.*, 1997, com algumas modificações)

Alíquotas de 50 µL foram submetidas a tratamento térmico (temperaturas de 60^o, 70^o, 100^o C), durante 30 e 60 minutos, em banho-maria. Após esses intervalos de tempo, retiraram-se as alíquotas, procedendo-se à revelação pelo meio de difusão em “well”. O método consistia em fazer a revelação como já descrito anteriormente em 4.3. Fizeram-se “wells” de 7 mm de diâmetro na superfície do ágar, utilizando-se um dispositivo específico para tal (com furador). Em cada “well”, adicionou-se cada uma das alíquotas, incubando-se as placas a 37^oC, em anaerobiose, por 24 e 48 horas. Uma alíquota também foi tratada em autoclave, por 15 minutos, a 121^oC, sendo testada quanto a sua atividade residual. Como controle, utilizou-se uma alíquota sem o tratamento térmico.

4.5.4 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTAGONISTA A VARIAÇÕES DE pH (GOMEZ *et al.*, 1997, com algumas modificações)

A estabilidade da substância antimicrobiana foi testada em diferentes valores de pH, ajustados em 3 a 9, com NaOH 5N ou HCl 5N no extrato bruto já centrifugado e filtrado. Após serem liofilizadas e ressuspendidas, como citado em 4.4, as alíquotas foram novamente filtradas, fazendo-se a revelação, quanto à atividade antimicrobiana residual, pelo método de difusão em poços. De cada alíquota de pH, 50 µL foram adicionados aos poços, utilizando-se como controle o extrato bruto sem alteração do pH. Como bactérias reveladoras, foram utilizadas as amostras citadas em 4.5.

4.5.5 SUSCEPTIBILIDADE DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA À AÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS (DRUMMOND, 2001; FARIAS *et al.*, 1992)

Alíquotas concentradas por liofilização e ressuspendidas dez vezes em relação ao volume inicial foram acrescidas da solução de cada enzima, na concentração final de 1 mg/mL. As seguintes enzimas foram utilizadas: α quimiotripsina (E.C. 3.4.21.1, tipo II, Sigma-Aldrich, USA); tripsina (E.C.3.4.21.4, tipo II, Sigma-Aldrich, USA); Papaína (E.C.3.4.23.1, Sigma-Aldrich, USA), todas dissolvidas em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0). Como controle, foram testados o tampão, as enzimas e o extrato bruto. Após um período de incubação de uma hora, a 37°C, retirou-se uma alíquota

de 50 μL , que foi testada pelo método de difusão em poços, como descrito no item 5.5. O desaparecimento do halo de inibição indicava a susceptibilidade à enzima específica e a natureza protéica da substância antimicrobiana.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA

A tab. 1 representa o teste de antagonismo *in vitro*.

A freqüência de antagonismo se apresenta nas seguintes proporções: *P. intermedia/nigrescens* (6/6), *B. adolescentis* (5/6), *C. butyricum* e *P. micros* (4/6). A menor capacidade de antagonismo foi apresentada por *G. morbillorum* (2/6).

Tabela 1

Determinação qualitativa da produção de substâncias antagonistas –
Teste de Antagonismo *in vitro*.

PRODUTORAS	REVELADORAS						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>G. morbillorum</i> (1)	NT	0	0	0	0(*)	(**)12,4 ± 0,5(***)	10,4±0,6
<i>B. adolescentis</i> (2)	10,2±0,3	NT	11,9±0,45	12,7±0,3	10,2±0,35	0	11,1±0,1
<i>C. butyricum</i> (3)	12,5±0,25	11,4±0,45	NT	10,0±0,5	0	0	12,0±0,5
<i>F. nucleatum</i> (4)	15,5±0,5	0	14,4±0,41	NT	15,2±0,3	0	0
<i>P. micros</i> (5)	18,6±0,3	0	17,5±0,5	0	NT	16,3±0,4	17,6±0,3
<i>L. acidophilus</i> (6)	13,0±0,47	0	0	11,3±0,45	0	NT	10,3±0,4
<i>P. intermedia</i> (7)	15,8±0,2	16,5±0,47	15,4±0,45	18,5±0,45	14,6±0,76	15,8±0,5	NT

*= presença de halo de inibição **= média ***= Desvio padrão NT= não testada

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA NATUREZA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA

Pelo fato de o fenômeno de antagonismo apresentado por *C. butyricum* ter sido bastante freqüente no presente estudo, além de pouco relatado na literatura, os passos seguintes de caracterização de substância antagonista se deram com a utilização daquela bactéria.

5.2.1 PESQUISA DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS

Não foram evidenciadas zonas de lise no teste para a detecção de bacteriófagos, o que descarta esta hipótese como sendo responsável pelo antagonismo.

5.2.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PELA PRESENÇA DE ÁCIDOS

Observou-se uma diminuição acentuada do pH dentro dos halos de inibição, em relação às placas controle, cujo pH foi 6,47.

Utilizando-se *F. nucleatum* como bactéria reveladora, obteve-se pH 4,42 fora dos halos de inibição e 4,44 dentro dos halos de inibição, não apresentando assim diferenças significativas. O *B. adolescentis* apresentou, respectivamente, pH de 4,14 e 4,16.

Os resultados demonstram a ausência de influência dos ácidos na inibição do crescimento das espécies testadas.

5.2.3 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE ANTAGONISTA A VARIAÇÕES DE TEMPERATURA

Observou-se que a substância antagonista manteve-se estável às temperaturas de 60°, 70° e 100°C, independentemente do tempo de exposição, sendo inativada somente quando submetida à temperatura de 121°C, por 15 minutos (Tab. 2).

Os resultados sugerem que as substâncias antagonistas são termo-resistentes.

TABELA 2

Estabilidade da substância antagonista a variações de temperatura		
Temperatura	Amostras Reveladoras	
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
60° C – 30 minutos	13,77* ± 0,20**	12,14 ± 0,55
60° C – 60 minutos	11,26 ± 0,35	9,74 ± 0,15
100° C – 30 minutos	14,08 ± 0,15	17,37 ± 0,95

100°C – 60 minutos	12,05 ± 0,25	13,47 ± 0,51
121°C – 15 minutos	0	0
controle	12,78 ± 0,25	14,18 ± 0,3

* = tamanho dos halos de inibição (mm)

**= Desvio padrão

5.2.4 ESTABILIDADE DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA A VARIAÇÕES DE pH

A substância antagonista produzida por *C. butyricum* mostrou-se estável às variações de pH, num intervalo de 3,0 a 6,0. Acima desses valores (pH de 7,0 a 9,0), não se evidenciou a presença de halo de inibição (Graf.1 e 2). Foram utilizados como microrganismos reveladores o *B. adolescentis* e o *F. nucleatum*.

Como controle, foi utilizado o meio sem o inóculo. O meio BHI-s apresentava halos de inibição quando concentrado (liofilização), sugerindo possível interferência de componente(s) do meio no fenômeno de inibição.

O meio AC, quando utilizado como controle, não apresentou halos de inibição.

Os resultados obtidos nos gráficos 1 e 2 mostram maior atividade das substâncias antagonistas em pHs ácidos.

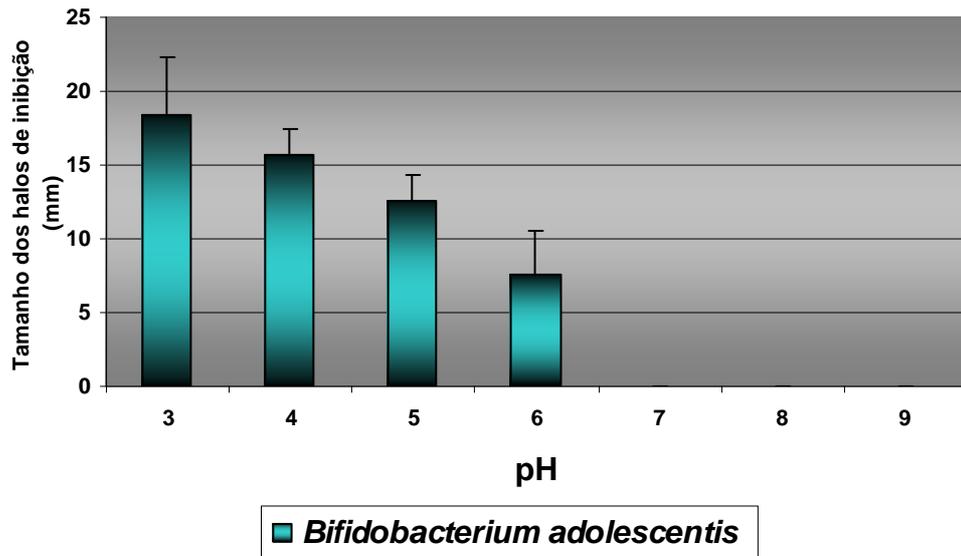


GRÁFICO 1 – Influência do pH na produção de substância antagonista, utilizando-se como reveladora *Bifidobacterium adolescentis*

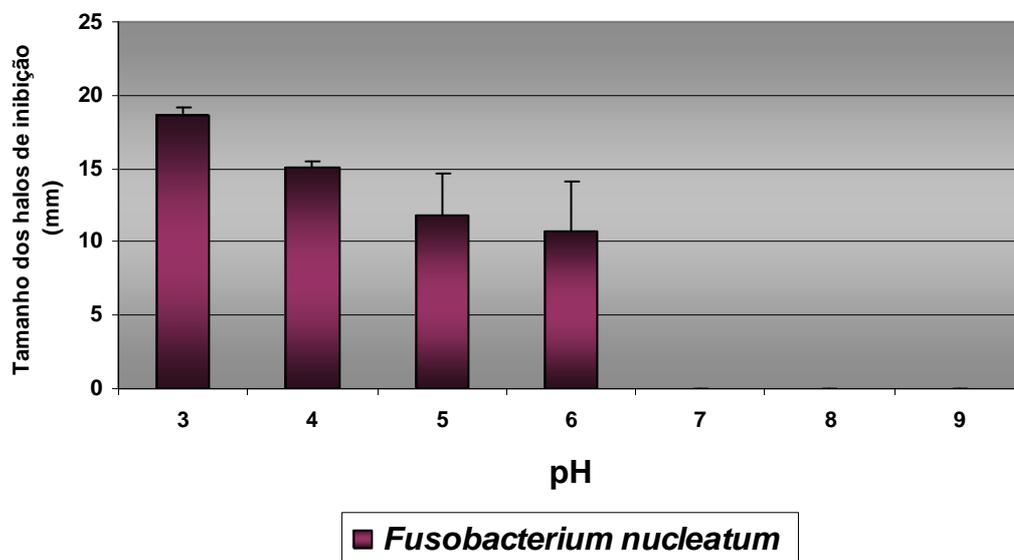


GRÁFICO 2 – Influência do pH na produção de substância antagonista, utilizando-se como reveladora *Fusobacterium nucleatum*

5.2.5 SUSCEPTIBILIDADE DA SUBSTÂNCIA ANTAGONISTA À AÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

A substância antagonista produzida por *C. butyricum* não foi inativada por nenhuma das enzimas testadas. Foram observados, ao redor dos poços, halos de inibição contendo enzimas e substância liofilizada (Tab. 3).

Os resultados sugerem que as substâncias antagonistas não apresentam estrutura protéica.

TABELA 3

Susceptibilidade da substância antagonista à ação de enzimas proteolíticas – Ação das enzimas tripsina, quimiotripsina e papaína sobre a atividade antagonista de *Clostridium butyricum*

Enzimas	Amostras Reveladoras	
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
Papaína	0	0
Papaína c/ substância	18,45* ±0,55**	12,76 ±0,35
Quimiotripsina	0	0
Quimiotripsina c/ substância	12,43 ±0,8	15,93 ±0,47
Tripsina	0	0
Tripsina c/ substância	13,1 ±0,65	14,73 ±0,25
Tampão Fosfato de Sódio***	0	0
Substância liofilizada***	14,75 ±0,49	14,47 ±0,60

* = tamanho dos halos de inibição (mm)

** = desvio padrão

*** = Controles

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As interações entre bactérias têm papel determinante na sucessão bacteriana que se processa em um determinado sítio. É por meio daquele mecanismo que espécies pioneiras criam condições para que outros microrganismos venham a ser selecionados como próximos habitantes daquele ecossistema (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2003b).

Muitos pesquisadores têm dado ênfase a tais interações (BOLSTAD *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1994a, b; JUNG *et al.*, 2000; LANA *et al.*, 2001; RÔÇAS *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2002; SIQUEIRA Jr., 2003a, b; SUNDQVIST, 1992a, b, 1994), mas ainda há poucos estudos sobre a caracterização das substâncias antagonistas e/ou sinérgicas produzidas por bactérias isoladas de infecções endodônticas. Ante a ausência de relatos na literatura, foram avaliadas no presente trabalho as interações entre espécies e a produção de substância antagonista por bactérias recém-recuperadas de SCRs infectados. As amostras selecionadas incluíram as bactérias Gram-positivo e Gram-negativo mais prevalentes em infecções de origem endodôntica, segundo estudo de LANA *et al.*, (2001).

Para se avaliar as interações bacterianas *in vitro*, utilizou-se a técnica de difusão em ágar, que é amplamente empregada para selecionar bactérias produtoras de substâncias antagonistas. A técnica, entretanto, apresenta algumas limitações: o halo de inibição pode ser resultante da ação de mais de um tipo de substância e os resultados podem variar em função de vários outros parâmetros, tais como pH e temperatura (LINTON, 1983). Além dos fatores

citados, a interpretação do espectro de atividade inibitória pode, algumas vezes, ser dificultada quando uma amostra produz mais de um agente bactericida ou outros produtos como ácidos e peróxido de hidrogênio (TAGG *et al.*, 1976).

Segundo TAGG *et al.* (1995), é importante ressaltar que, *in vitro*, a detecção de substâncias antagonistas depende da criação ou da simulação das mesmas condições encontradas *in vivo* (pH, temperatura, nutrientes).

Neste estudo os microrganismos mais sensíveis às substâncias antagonistas foram *P. intermedia/nigrescens* e *B. adolescentis*. A *P. intermedia/nigrescens* é freqüentemente isolada de infecções de origem endodôntica e periodontal (GHARBIA *et al.*, 1993), e, segundo RODRIGUES (2001), ela possui atividade antagonista contra *F. nucleatum* e outras espécies não avaliadas aqui. O resultado assemelha-se aos apresentados no presente estudo.

Utilizando o “odds ratio” para determinar as associações entre as bactérias presentes em infecções de origem endodôntica, LANA *et al.* (2001) relataram que *P. intermedia* apresenta sinergismo muito fraco com *F. nucleatum*, *L. acidophilus* e *P. micros*. Os autores relataram, ainda, um forte sinergismo entre *P. intermedia/nigrescens* e *C. butyricum*. Os resultados do presente trabalho não corroboram tais diferenças, uma vez que *P. intermedia/nigrescens* inibiu todas as amostras testadas. Contudo, é importante ressaltar que este estudo baseou-se em análises *in vitro*, e o daqueles autores, *in vivo*.

O gênero *Bifidobacterium* é habitante do intestino humano, sendo comumente usado como prebiótico. A maioria das espécies que colonizam a cavidade oral são consideradas parte da microbiota transitória (CHÁVEZ DE

PAZ, *et al.*, 2004). *B. adolescentis* tem sido esporadicamente isolado de infecções do SCR (LANA *et al.*, 2001; RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, 2001; SUNDQVIST, 1994). Interações dessa bactéria com outras espécies só encontra relato em um estudo realizado por RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, (2001), no qual se observou que *B. adolescentis* inibia somente *F. nucleatum*. No presente estudo, a espécie só não produziu substância antagonista contra *L. acidophilus*.

G. morbillorum foi a espécie menos sensível à ação das substâncias antagonistas e apresentou antagonismo somente com *L. acidophilus* e *P. intermedia*. Tal resultado confronta, mais uma vez, os de RIBEIRO SOBRINHO *et al.*(2001), que relataram alta atividade antagonista de *G. morbillorum* contra *B. adolescentis*, *C. butyricum* e *F. nucleatum*.

Quanto à atividade inibitória de *C. butyricum*, a bactéria inibiu o crescimento de *B. adolescentis*, *P. intermedia/nigrescens* e *F. nucleatum*, e apresentou uma inibição muito fraca contra *G. morbillorum*. Segundo RIBEIRO SOBRINHO *et al.* (2001), *C. butyricum* não mostrou atividade inibitória contra *G. morbillorum*, *B. adolescentis* e *F. nucleatum*, resultados que estão de acordo com os achados de LANA *et al.* (2001), os quais relataram haver um sinergismo muito fraco e envolvendo somente *P. micros* e *L. acidophilus*.

Semelhantemente ao que foi encontrado por RIBEIRO SOBRINHO *et al.* (2001), *F. nucleatum* inibiu *G. morbillorum*, a qual apresentou sinergismo com *P. intermedia/nigrescens* e *L. acidophilus*. Por sua vez, SUNDQVIST (1992a) relatou atividade sinérgica entre *F. nucleatum* e *P. micros*, resultados que também não foram corroborados no presente trabalho.

O gênero *Lactobacillus* foi isolado de infecções do SCR (CHÁVEZ DE PAZ *et al.*, 2004; DRUCKER *et al.*, 1992; SUNDQVIST, 1992a), principalmente da porção coronária, exposta à cavidade oral. No presente estudo, *G. morbillorum*, *F. nucleatum* e *P. intermedia* foram as únicas espécies inibidas por *L. acidophilus*. Foi verificado por LANA *et al.*(2001) que existia sinergismo entre *L. acidophilus* e *P. intermedia/nigrescens* e *F. nucleatum*, e, ainda, um sinergismo muito discreto foi encontrado entre *C. butyricum* e *P. micros*, o que contradiz os presentes resultados.

A ocorrência de *P. micros* tem sido observada com frequência em diferentes sítios humanos. Em infecções do SCR, tem sido encontrado positivamente associado com *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *L. acidophilus* (SUNDQVIST, 1992 a; LANA *et al.*, 2001). Tais dados não coincidem, em parte, com os obtidos no presente estudo, visto que *P. micros* inibiu o crescimento de *G. morbillorum*, *C. butyricum*, *L. acidophilus* e *P. intermedia*, mas não inibiu *F. nucleatum*.

Conforme avaliado acima, muitos dos resultados apresentados na literatura divergem dos relatados no presente estudo. É interessante ressaltar que as diferenças na expressão da atividade antagonista podem estar associadas ao meio de cultura e às condições de cultivo (RODRIGUES, 2001), o que pode justificar os diferentes resultados aqui obtidos, além das outras variáveis já citadas, que também podem interferir na produção de substância antagonista. SUNDQVIST (1992 a) utilizou o meio de cultura PYG para selecionar as bactérias por ele isoladas de SCRs infectados, RIBEIRO SOBRINHO *et al.* (2001) utilizaram o meio BHI-s. No presente estudo foram utilizados os meios BHI-S e MRS.

Além de avaliar as interações microbianas, neste estudo procurou-se caracterizar parcialmente substância antagonista produzida por *C. butyricum*, microrganismo que apresentou atividade antagonista contra 4 das 7 amostras testadas. Ademais, o gênero *Clostridium* tem sido pouco estudado.

Para se caracterizar parcialmente a substância antagonista produzida por *C. butyricum*, foi necessária a seleção de um meio de cultura ideal. A princípio, utilizou-se o meio BHI-S. Halos claros e nítidos foram observados contra as amostras testadas. Durante a verificação da influência do pH na estabilidade da substância antagonista, foi verificado que o meio BHI-s sem inóculo (controle), quando concentrado, produzia halos de inibição em todas as faixas de pH testadas, inclusive no pH 7,2, que é o pH do meio BHI-s. Tal fato desencorajou a utilização de tal meio de cultura, acreditando-se que o NaCl nele presente, quando concentrado, poderia ser responsável pela produção de zonas de inibição.

Apesar disso, não há consenso na literatura quanto aos meios de cultura utilizados na caracterização de substâncias antagonistas produzidas por bactérias do gênero *Clostridium*. Optou-se aqui, então, pela utilização do meio AC, o qual, segundo KEMPERMAN *et al.* (2003), é específico para a produção de bacteriocinas por aqueles microrganismos. O meio AC possui pH que varia entre 7,0 a 7,4, sem o inóculo.

Na fase subsequente, quando utilizado o meio AC para se avaliar a produção de substância antagonista, observou-se a produção de halos nublados e não muito grandes, diferentes dos obtidos quando da utilização do meio BHI-s.

Segundo a literatura, o *Clostridium* apresenta um crescimento ótimo numa faixa de pH entre 4,5 e 5,0. Em relação ao pH do meio de cultura selecionado (AC), utilizou-se uma faixa de 3,5 a 9,5. Verificou-se que a produção de substância antagonista, tanto contra as amostras de *B. adolescentis*, quanto de *F. nucleatum*, apresentou estabilidade na faixa de pH entre 3,5 e 6,5.

No teste de antagonismo pela técnica de difusão em ágar, fatores de interferência, como fagos, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, precisam ser descartados, pois produzem halos de inibição semelhantes aos produzidos por bacteriocinas (DRUMOND, 2001).

Em relação à participação de ácidos orgânicos na produção de halos de inibição, segundo DRUMOND (2001), os ácidos láctico e acético exercem efeito antagonista, não só pela ação antimicrobiana, mas também pela redução do pH do meio de cultura, podendo, assim, inibir o crescimento de outras bactérias. A literatura relata que bactérias do gênero *Clostridium* produzem ácido butírico, acético, fórmico, láctico e succínico, além de produzirem, algumas vezes, butanol e etanol (SCHINK *et al.*, 1981; SCHINK & ZEIKUS, 1980, 1982). Neste estudo, no entanto, a produção de ácidos não interferiu na inibição das amostras reveladoras. Mas, segundo DE MUYNCK *et al.* (2004), ajustando-se o valor do sobrenadante entre 4,5 e 5,0, que é o pH ideal de crescimento de *C. butyricum*, pode-se excluir a atividade antagonista de ácidos orgânicos, com a certeza de que tal fator não interfere na inibição das amostras testadas.

Quanto à estabilidade da substância antagonista frente a variações de temperatura, observou-se que ela é estável em temperaturas de 60°, 70° e 100° C, em intervalos de tempo de 30 e 60 minutos, sendo inativada quando exposta a 121°C, por 15 minutos. A estabilidade de substâncias antagonistas em

temperaturas altas é característica de substância de natureza não protéica, apesar de ser relatado na literatura que algumas bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* são estáveis em temperaturas elevadas (DRUMOND, 2001).

Segundo TAGG *et al.* (1976), as bacteriocinas são inativadas por pelo menos uma enzima proteolítica. As enzimas Tripsina, α quimiotripsina e papaína não inativaram a substância antagonista produzida por *C. butyricum*, sugerindo sua natureza não protéica.

Os resultados aqui obtidos indicam que, apesar da substância antagonista produzida por *C. butyricum* não apresentar natureza protéica, ela deve ser melhor caracterizada e purificada em estudos futuros, devido à sua provável influência na sucessão ecológica que se processa no interior dos SCRs infectados.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Todas as amostras bacterianas selecionadas exibiram alguma atividade antagonista, para mais de uma reveladora, incluindo bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, especificamente *P. intermedia* e *B. adolescentis*.
2. A expressão da atividade antagonista de *C. butyricum* é influenciada pela composição do meio de cultura, pelo pH e pela temperatura.
3. A produção de ácidos não influenciou na inibição das amostras reveladoras testadas.
4. A estabilidade da substância antagonista à ação de enzimas proteolíticas sugere não ser ela de natureza protéica, havendo necessidade de outros estudos para sua identificação.
5. A estabilidade a substância antagonista á temperaturas de 60°, 70° e 100° C, sugere ser uma substância termo-tolerante.

8 ABSTRACT

The oral microbiota is composed by about 500 bacteria species, but, in a given endodontics infection, only about 1 to 12 species are recovered. Factors such as bacterial interactions, by the action of antagonist substances and bacteriocins, can influence bacterial growth in this site. In this study, bacterial interactions that occur among microorganisms recently recovered from human endodontics infections are evaluated *in vitro*. With this objective, the diffusion technique in agar by the use of different culture media (agar BHI-S, MRS e AC) was used. The antagonist substance produced by *Clostridium butyricum* was also partially characterized. The bacterial species selected were: *Bifidobacterium adolescentis*, *Gemella morbillorum*, *Clostridium butyricum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus. micros*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella intermedia/nigrescens*. Synergism wasn't observed among the selected species, while Antagonism was detected among the following interactions: *G.morbilloorum* and *L. acidophilus*, *P. intermedia/nigrescens*; *B. adolescentis* and *G.morbilloorum*, *C. butyricum*, *F. nucleatum*, *P. intermedia/nigrescens*, *P. micros*; *C. butyricum* and *B. adolescentis*, *G. morbillorum*, *F. nucleatum*, *P. intermedia/nigrescens*; *F. nucleatum* and *B. adolescentis*, *C. butyricum*, *P. micros*; *P. micros* and *B. adolescentis*, *C. butyricum*, *P. intermedia/nigrescens*, *L. acidophilus*; *L. acidophilus* and *B. adolescentis*, *F. nucleatum*; *P. intermedia/nigrescens* and all the producing species. The presence of bacteriophages in the inhibition zones wasn't detected. It can be observed that the type of culture media used

interfered in the results: the AC media, when concentrated, showed better results than the BHI-S. Finally, the results referring to partial characterization of the substance produced by *C. butyricum* showed that it is stable in pH ranging from 3.5 to 6.5 and in temperatures of 60°, 70° and 100°C; being insensitive to the action of proteolytic enzymes: trypsin, alpha-chymotrypsin and papain, therefore demonstrating that it is a thermo-resistant antagonist substance and apparently of non-proteinic nature. The results confirm data from literature, which indicate that factors such as pH, culture media and temperature interfere in the expression of antagonist substance activity, therefore being important ecological determinants in the selection of bacteria on the inside of the Root Canal Systems.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAE, K.S., BAUMGARTNER, J.C., SHEARES, T. R., DAVID, L. L. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 23, n.10, p. 620-623, Oct. 1997.

BAUMGARTNER, J. C., FALKLER, W. Q. Bacterial in the apical 5 mm of infected root canals. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v.17, n 8, p. 380-383, 1991.

BAUMGARTNER, J.C., KHEMALEELAKUL, S., XIA, T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 29, n. 12, p. 794-797, Dec. 2003.

BOLSTAD, A. L., JENSEN, H., BAKKEN, V. Taxonomy, biology and periodontal aspects de *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, p. 55-71, 1996.

CARVALHO, S. A., *Pesquisa de Enterotoxinas e de substâncias Antagonistas tipo Bacteriocina produzidas por amostras de Staphylococcus aureus recuperadas de alimentos*. 2002, 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

CLARKE, D.J., MORRIS, J.G. Butyricin 7423: a Bacteriocin produced by *Clostridium butyricum* NCBI7423. *Journal of General Microbiology*, v. 95, p. 67-77, 1976.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of food microbiology*, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, Dec. 2001.

CHAVES DE PAZ, L.E. MOLANDER, A. DAHLÉN, G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 37, p. 579-587, 2004.

DAHLÉN, G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 208-239, Jan. 2002.

DAW, M. A., FALKINER, F. R. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, Oxford, v. 27, n. 6, p. 467-479, Dec. 1996.

DE MUYNCH, C. LEROY, A.I.J., DE MAESENEIRE, S., ARNAUT, F., SOETAERT, W., VANDAMME, E.J. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological research*, v. 159, p. 339-346, 2004

DRUCKER, D. B., LILLEY, J. D., TUCKER, D., GIBBS, A. A. C. The endodontic microflora revisited. *Microbios*, n. 71, p. 225-34, 1992.

DRUMMOND, R.M.N. *Obtenção, caracterização e purificação parciais de substância antagonista produzida por Lactobacillus murinus*. 2001. 133p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

FABRICIUS, L., DAHLEN, G., HOLM, S., MÖLLER, A. J., Influence of combinations of oral bacterial on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 200-206, June 1982.

FARBER, P. A., SELTZER, S. Endodontic microbiology. I. Etiology. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 14, n. 7, p. 363-371, July, 1988.

FARIAS, L. M., CARVALHO, N. A. R., DAMASCENO, C. A. V., CISALPINO, E. O., VIEIRA, E. C.. Bacteriocin-like activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. *Research in Microbiology*, Paris, v. 143, n. 2, p. 151-9, 1992.

GHARBIA, S. E., SAHAH, H. N., Interactions between black-pigmented Gram-negative anaerobes and other species, witch may be important in disease development. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 6, n. 2-3, p. 173-177, Mar. 1993.

GOMES, B. P. F. A., PINHEIRO, E. T., GADÊ-NETO, C. R., SOUZA, E. L. R., FERRAZ, C. C. R., ZAIA, A. A., TEIXEIRA, F. B., SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology Immunology*, Copenhagen, v.19, n. 2, p. 71-76, Apr. 2004.

GOMES, B. P. F. A. , DRUCKER, D. B., LILLEY, J. D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 27, p. 291-298, 1994a.

GOMES, B. P. F. A. DRUCKER, D. B., LILLEY, J. D. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios*, v. 80, p. 231-243, 1994b.

GOMES, B. P. F. A., LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 29, p. 69-75, 1996a.

GOMES, B. P. F. A., LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B.. Clinical significance of dental root canal microflora, *Journal of Dentistry*, v. 24, n. 1-2, p. 47-55, 1996b.

GOMEZ, S., COSSON, C., DESCHAMPS, A. M.. Evidence for a bacteriocin-like substance produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory to Gram-positive food borne pathogens. *Research in Microbiology*, Paris, v. 148, n. 9, p. 757-766, Dec. 1997.

GRENIER, D., MAYRAND, D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infection and Immunity*, v. 53, n. 3, p. 616-620, Sept. 1986.

HAAPSALO, M.. *Bacteroides* spp. In dental root canal infections. *Endodontic & Dental Traumatology*, Copenhagen, v. 5, n. 1, p. 1-10, 1989.

HAAPSALO, M. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 6, p. 213-218, Apr.1993.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H.A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 9. ed. 1994, 787p.

JACK, R. W., TAGG, J. R., RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 59, n. 2, p. 171-200, June 1995.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, G.E.A. *Microbiologia Médica* . 21^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000, 524p.

JUNG, LL., CHOI, B., KUM, K., ROH, B., LEE, S., LEE, C., PARK, D.. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 26, n. 10, p. 599-604, Oct. 2000.

KAKEHASHI, S., STANLEY, H. R., FITSGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, St. Louis, v. 20, n. 3, p. 340-349, Sept. 1965.

KEMPERMAN, R., KNIPERS, A., KARSENS, H., NAUTA, A., KUIPERS, O., KOK, J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and clostricin 574. *Applied and environmental microbiology*, v.69, n.3, p. 1589-1597, Mar. 2003.

KETTERING, J. D., TORABINEJAD, M. *Microbiologia e Imunologia*. In: COHEN, S., BURNS, R. C. *Caminhos da Polpa*. 6^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, cáp.13, p. 364-377.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 12, p. 39-86, 1993.

KLIJN, N., NIEUWEHOF, J. D., HOOLWERF, C. B., VAND DER WAALS, WEERKAMP, A. H., Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 2919-2924, Aug. 1995.

KURIHARA, H., KOBAYASHI, Y., FRANCISCO, I. A., ISOSHIMA, O., NAGAI, A., MURAYAMA, Y. A microbial and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 21, n.12, p. 617-621, Dec. 1995.

LANA, M.A. *Avaliação microbiológica de canais radiculares com necrose pulpar em três etapas do tratamento endodôntico*. 1999. 142f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

LANA, M. A., RIBEIRO-SOBRINHO, A. P., STEHLING, R., GARCIA, G. D., SILVA, B. K. C., HAMDON, J. S., NICOLI, J. R., CARVALHO, M. A. R., DE M,

F. L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 16, n. 2, p. 100-105, Apr. 2001.

LINTON, A.H. Theory of antibiotic inhibition zone formation, disc sensitivity methods and MIC determinations. In: *Antibiotics: Assessment of Antimicrobial activity and resistance*. Denver, A.D. and Quesnel, L.B. (Ed), London, p. 19-30, 1983.

LOPES, H. P., SIQUEIRA JR., J. F. Microbiologia Endodôntica. In: *Endodontia, Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, cap. 10, p. 185-216.

MAHONY, D. E., LI. A.. Comparative study of ten bacteriocins of *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Canada v. 14, n. 6, p. 886-892, 1978.

MAYRAND D, GRENIER D. Bacterial interactions in periodontal diseases. *Bulletin De'l Institut Pasteur*, Paris, v. 96, p. 125-133, 1998.

MOLANDER A., REIT, C., DAHLÉN, G., KVIST, T. Microbial status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan. 1998

MOLONGOSKI, J. J. E., KLUG, M. J. Characterization of anaerobic, heterotrophic bacteria isolated from fresh-water lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.31, p.83-90, 1978

NAIDU, A. S., BIDLACK, W.R., CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, v. 38, p. 13-126, 1999.

NIKU-PAAVOLA, M.L., LAITILA, A., MATTILA-SANDHOLM, T., HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, n. 86, p. 29-35, 1999.

NISENGARD, R. J., NEWMAN, M. G., ZAMBON, J. J. *Bacillus e Clostridium*, In: *Microbiologia Oral e imunologia*, cap. 15, p.177, 178, Nisengard & Newman, 2 ed., Ed. Guanabara Koogan, 1997.

OLIVEIRA, A. A. P., *Pesquisa de substâncias tipo-bacteriocina produzidas por amostras do gênero Fusobacterium isoladas da cavidade oral de primatas*

humanos e não humanos. 1997. 111f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

PETERS, L. B., WESSELINK, P. R., van WINKELHOFF, A. J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 35, n.8, p. 698-702, Aug. 2002.

PIARD, J.C., DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism and products. *Lait*, n. 71, p. 525-541, 1991.

PINHEIRO, E. T., GOMES, B. P. F. A., FERRAZ, C. C. R., SOUZA, E. L. R., TEIXEIRA, F. B., SOUZA-FILHO, F. J.. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jan. 2003.

PITT, T. L., SAUNDERS, N. A. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 53, n. 1, p. 71-75, Jan. 2000.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P., BARROS, M.F.M., NICOLI, J.R., CARVALHO, M.A.R., FARIAS, L.M., BAMBIRRA, E.A., BAHIA, M.G.A., VIERIA, E.C., Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *Journal of endodontics*, Baltimore, v. 24, p. 405-408, 1998.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P., LANA, M.A., FARIAS, L.M., CARVALHO, M.A.R., NICOLI, J.R., UZEDA, M., VIEIRA, L.Q. Implantation of bacteria from human pulpal necrosis and traslocation from root canals in gnotobiotic mice. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 27, n. 10, p. 605-609, Oct. 2001

RILEY, M. A., GORDON, D. M., Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, v. 32, p. 255-278, 1998.

RILEY, M. A., WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 117-137, Oct. 2002

RÔÇAS, I. N., SIQUEIRA JR., J. F., SANTOS, K. R. N., COELHO, A. M. A. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral*

Surgery Oral Medicine Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, St. Louis, v. 91, n. 4, p. 468-71, Apr. 2001.

RODRIGUES, P. H.. *Bastonetes Gram-negativos produtores de pigmento negro de pacientes com periodontite crônica: isolamento, avaliação da atividade antagonista, caracterização e purificação parcial de substâncias antagonistas tipo bacteriocina.*, 2001. 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ROLPH, H. J., LENNON, A., RIGGIO, M. P., SAUNDERS, W. P., MACKENZIE, D., COLDERO, L., BAGG, J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3282-3289, Sept. 2001.

ROOD, J. I., CLOE, S. T., Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiology Reviews, Washington*, v. 55, p. 621-648, 1991.

SABETI, M., NOWZARI, H., SIMON, J. H., KERMANI-ARAB, V., SLOTS, J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbiology Immunology, Copenhagen*, v. 18, n. 2, p. 104-108, Apr. 2003.

SCHINK, B., WARD, J. C., ZEIKUS, J. G. Microbiology of wetwood: importance of pectin degradation and *Clostridium* species in living trees. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, p. 526-532, 1981.

SIQUEIRA Jr. *Tratamento das infecções endodônticas*. Rio de Janeiro: Medsi, 1997. 196p.

SIQUEIRA Jr. , J. F., RÔÇAS, I. N., FAVIERI, A., OLIVEIRA, J. C. M., SANTOS, K. R. N.. Polymerase chain reactions detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *International Endodontic Journal, Oxford*, v. 34, n.4, p. 280-284, June 2001a.

SIQUEIRA Jr. , J. F., RÔÇAS, I. N., LOPES, H. P., ELIAS, C. N., UZEDA, M. Fungal infection of the radicular dentin. *Journal of Endodontics, Baltimore*, v. 28, n. 11, Nov. 2002b.

SIQUEIRA Jr., J. F., RÔÇAS, I. N., OLIVEIRA, J. C. M., SANTOS, K. R. N.. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 27, n. 9, p. 563-566, Sept 2001b.

SIQUEIRA Jr. , J. F., RÔÇAS, I. N.. *Pseudoramibacter alactolyticus* in Primary Endodontic infections. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v.29, n. 11, p. 735-738, Nov. 2003c.

SIQUEIRA Jr., J. F., RÔÇAS, I. N. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontics infections. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 36, n. 3, p. 174-180, Mar. 2003a.

SIQUEIRA Jr., J. F., RÔÇAS, I. N., ALVES, F. R. F., SANTOS, K. R. N. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: A molecular investigation. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 30, n. 9, p. 638-643, Sept. 2004.

SIQUEIRA Jr., J. F., RÔÇAS, I. N., SOUTO, R., UZEDA, M., COLOMBO, A. P., *Actinomyces* species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 28, n. 3, p. 168-172, Mar. 2002a.

SIQUEIRA Jr., J. F., RÔÇAS, I. N.. Positive and Negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary Endodontic infections. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v.29, n. 7, p. 438-441, July 2003b.

SIQUEIRA Jr., J.F. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. Rio de Janeiro, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, St. Louis, v. 94, n. 3, p.281-293, 2002.

SLOTS, J., NOWZARI, H., SABETI, M. Cytomegalovirus in symptomatic periapical pathosis. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 37, n. 8, p. 519-524, Aug. 2004.

SNEATH, P. .H A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Williams & Wilkins*, v. 2 Seção 13 – Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci, p. 1141-1148, 1160, 1161, 1994.

SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A. D., DZINK, J. L., HILMAN, J. D. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology Immunology*, Copenhagen, v. 3, p. 1-7, 1988.

SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M.A., SMITH, C., KENT Jr, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, p. 134-144, 1998.

SUNDQVIST, G. *Bacteriological studies of necrotic dental pulps*. Umea, 1976. 94p. Dissertation (Master) – University of Umea, Sweden.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen, v.7, n. 5, p. 257-262, Oct, 1992a.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 18, n. 9, p. 427-430, Sept. 1992b.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 522-530, Oct. 1994.

SUNDQVIST, G., FIGDOR, D., PERSSON, S., SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* , St Louis, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998

SUNDQVIST, G., JOHANSSON, E., SJÖGREN, U. Prevalence of black pigmented *Bacteroides* species in root canal flora. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 15, n. 1, p. 13-19, Jan. 1989.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal*, Oxford, v. 31, n. 5, p. 311-325, Sept.1998.

TAGG, J.R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L.M. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*, v. 40, p. 722-756, 1976.

TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v. 100, n. 1, p. 52-59, Feb. 1992.

ZERR, M. A., COX, C. D., JOHNSON, W. T., DRAKE, D. R. Effect of red blood cells on the growth of *Porphyromonas endodontalis* and microbial community development. *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen, v. 13, p. 106-112, 1998.