

**Suzi Iolanda Vieira de Castro**

**A importância da identificação dos genes de resistência em  
infecções endodônticas**



**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2013**



**Suzi Iolanda Vieira de Castro**

**A importância da identificação de genes de resistência em  
infecções endodônticas**



**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto, 2013**

**Suzi Iolanda Vieira de Castro**

**A importância da identificação de genes de resistência em  
infecções endodônticas**

Assinatura

.....

(Suzi Iolanda Vieira de Castro)

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas”

Orientadora:

Professora Doutora Cristina Pina

Coorientadora:

Professora Doutora Inês Lopes Cardoso

## Sumário

A cavidade oral possui uma grande diversidade de microrganismos, na sua maioria bactérias. Estes microrganismos, associados a outros fatores, são os agentes etiológicos de cáries dentárias, que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), afetam cerca de 80% da população mundial, sendo considerado um grave problema de saúde pública. Uma das patologias mais comuns são as infecções endodônticas causadas por bactérias. Estas infecções são primeiramente tratadas por processos mecânicos realizados num consultório dentário. No entanto, estes tratamentos não conseguem aceder a toda a constituição do dente, o que, por vezes, torna necessário o uso de agentes farmacológicos antibacterianos.

Ao longo do tempo, o uso indiscriminado de antibióticos levou ao aparecimento de resistências a estes agentes farmacológicos, como resultado dos mecanismos de sobrevivência microbianos. Estas resistências representam um perigo para a saúde pública, pois reduzem os recursos eficazes para o tratamento endodôntico, assim como para todas as infecções. Estas resistências afetam sobretudo a máquina genética dos agentes bacterianos, que transmitem rapidamente os genes de resistência às estirpes bacterianas sucessoras. Alguns destes genes de resistência associados a estas infecções da cavidade oral já foram devidamente identificados, permitindo assim que a comunidade científica e médica possa desenvolver novos agentes antibacterianos para combater estas infecções, permitindo também uma prescrição de antibioterapia mais correta.

Através de um estudo de revisão bibliográfica, esta tese tem como principais objetivos: (1) clarificar a relevância da identificação de genes de resistência a antibióticos em infecções endodônticas, (2) a importância da farmacoterapia para o desenvolvimento destes mecanismos de defesa e, (3) os cuidados a ter em conta na administração dos mesmos.

## Abstract

A rich microorganism biodiversity (e.g. bacteria, fungi and protozoa) is characteristic of the oral cavity. The etiologic cause of caries is the combination of these microorganisms with other factors (e.g. trauma). According to the World Health Organization (WHO), around 80% of the world population is affected by dental caries, being considered a serious health problem. One of the most prevalent pathologies are bacterial endodontic infections that, in the first place, are treated by mechanical treatments performed at the dental office. However, often these treatments fail to access the entire tooth surface, making necessary the use of antibacterial agents.

The indiscriminate use of antibiotics has led to the appearance of antibiotic resistance as a consequence of bacteria survival mechanisms. The antibiotic resistance represents a major threat to public health, reducing effective resources to infection treatment. This resistance influences the bacterial genetic machinery, allowing the development and transmission of resistance genes to the successor's strains. Some of these resistance genes have already been identified, mostly through appropriate molecular identification tests that led to a better understanding of the bacterial operation, giving the necessary means to the scientific community to develop new effective antibacterial agents.

Through a bibliographic review, the focuses of this thesis are: (1) to clarify the importance of antibiotic resistance genes in endodontic infections, (2) the pharmacology interference on bacterial resistance development and (3) administration care of these medical agents.



Aos meus Pais, por tudo que fizeram por mim.

Aos meus Avós, meus pilares.

Ao meu irmão, meu melhor amigo.

## Agradecimentos

Aos meus pais, Rosa e Joaquim, por todo o apoio e sacrifício que fizeram por mim ao longo da minha vida, com carinho especial pela minha mãe que é a minha melhor amiga.

Ao meu irmão, Hélio, que me acompanhou e me aconselhou em todo o meu percurso e que, apesar de não se encontrar no nosso país, continua a ser um importante pilar em todos os aspetos da minha vida.

Aos meus avós, Maria e Alberto, pela sabedoria que me transmitiram e me fizeram crescer a nível pessoal. Em especial ao meu avô Alberto que continuará sempre na minha memória pelos afetos, incentivos e palavras que nunca esquecerei.

À orientadora Prof. Doutora Cristina Pina e à coorientadora Prof. Doutora Inês Lopes Cardoso, pela disponibilidade que sempre me demonstraram e pelo auxílio relevante para a concretização desta tese de mestrado.

À Universidade Fernando Pessoa, agradeço a possibilidade que me ofereceram de me concretizar a nível académico, e em especial aos docentes e funcionários que fazem o ambiente de aprendizagem desta Universidade mais leve, mas sempre com a máxima exigência que o grau académico exige.

Às minhas amigas, Bruna André, Isabel Cardeal e Isis Santos, agradeço as gargalhadas, os abraços quando mais precisei, as alcunhas carinhosas, e, acima de tudo, a força que sempre me deram para me concretizar nos mais diversos campos da minha vida.

## Índice

Sumário .....	II
Abstract .....	III
Agradecimentos .....	V
Lista de figuras .....	VII
Lista de tabelas .....	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
0. Introdução geral .....	1
I. Introdução .....	3
II. Cavidade oral .....	5
II.1. Anatomia do dente.....	5
II.2. Microflora oral.....	7
III. Infecções da cavidade oral .....	9
III.1. Infecções endodônticas.....	9
III.2. Vias de Infecção .....	13
III.3. Fatores de virulência .....	14
IV. Métodos de identificação e caracterização dos agentes etiológicos das infecções endodônticas .....	17
IV.1. Métodos moleculares .....	18
V. Farmacoterapia em endodontia .....	21
V.1. Antibióticos de uso sistêmico .....	22
V.2. Mecanismos de ação dos antibióticos usados em endodontia.....	Error! Bookmark not defined.
VI. Resistência a antibióticos: Transferência génica e recombinação .....	34
VI.1. Resistência natural ou intrínseca .....	37
VI.2. Resistência adquirida .....	38
VI.2.i. Transferência horizontal de genes .....	40
VI.2.ii. Genes de resistência em bactérias da cavidade oral	45
VII. Uso adequado de antibióticos em endodontia .....	50
VIII. Conclusão .....	53
X. Referências Bibliográficas.....	54

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema de um dente saudável e de um dente inflamado/infetado.....	3
<b>Figura 2:</b> Anatomia do canal radicular.....	6
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo do desenvolvimento bacteriano após primeiro contacto com o tecido pulpar.....	10
<b>Figura 4:</b> Principais mecanismos de resistência a antibióticos.....	14
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo de uma bactéria contendo plasmídeos.....	43
<b>Figura 6:</b> Representação da estrutura de um IS.....	44

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Infecções endodônticas intra-radiculares.....	12
<b>Tabela 2:</b> Mecanismos de virulência de algumas classes de fatores de virulência.....	15
<b>Tabela 3:</b> Antibióticos mais usados em infecções endodônticas.....	24
<b>Tabela 4:</b> Mecanismo de ação de cada uma das classes dos antibióticos mais usados em endodontia.....	30
<b>Tabela 5:</b> Principais mecanismos de resistência atribuído a cada antibiótico.....	36
<b>Tabela 6:</b> Genes que conferem resistência bacteriana e o antibiótico correspondente...45	
<b>Tabela 7:</b> Genes de resistência identificados em bactérias da flora oral.....	48
<b>Tabela 8:</b> Recomendações estabelecidas para casos de terapêutica com antibióticos...52	

## Lista de abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AFSSAPS - Agência Francesa de Segurança Sanitária de Produtos Para a Saúde

AP-PCR - Reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários

ARN - Ácido Ribonucleico

ATP - Adenosina Trifosfato

rARN - Ácido Ribonucleico Ribossomal

*attC* - Local de integração com o local *attC* das cassetes génicas

*attI* - Local de integração com o local *attI* das cassetes génicas

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

dATP - Desoxiadenosina Trifosfato

dCTP - Desoxicitidina Trifosfato

dGTP - Desoxiguanosina Trifosfato

dTTP - Desoxitimidina Trifosfato

*e.g.* - *exempli gratia*

Fator R – Fator de Resistência

g - Gramas

*i.e.* - *id est*

IR - Sequências Nucleotídicas Invertidas

*IntI* - Gene Codificante da enzima Integrase

IS - Sequências de inserção

kb - Quilo pares de bases = 1 000 pb (medida genética que descreve o comprimento das cadeias de ADN e ARN)

Kg - Quilograma

LTA - Ácido lipoteicóico

LPS - Lipopolissacarídeos

mg - Miligramas

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

ORF's - *Open Reading Frames* (quadro de leitura aberto)

pb - Pares de bases (medida genética que descreve o comprimento das cadeias de ADN e ARN)

PBP's - *Penicilin-binding-protein* (proteína de ligação à penicilina)

Pc - Promotor que transcreve as cassetes génicas

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-ASO - Amplificação Alelo-Específica

PG - Peptidoglicano

PM - Peso Molecular

ppm - Partes por Milhão

sp - Espécie

spp - Espécies

UV - Ultra Violeta

## 0. Introdução geral

Este trabalho de investigação foi realizado no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde.

É inegável a importância da revisão bibliográfica como um meio de compilar os fundamentos teóricos e metodológicos presentes em artigos científicos relevantes, com espírito crítico, facilitando assim o acesso à informação, sobretudo em áreas consideradas de interesse público. Ao longo desta revisão são abordados, sobretudo, temas das áreas das Ciências Farmacêuticas e da Medicina Dentária.

Desde sempre, os problemas orais assombram o bem-estar da população, podendo ser mesmo causa de infeções que podem levar a problemas crónicos ou à morte. Durante décadas que são realizadas ações de consciencialização da população sobre a importância de bons hábitos de higiene oral como prevenção dos problemas orais. No entanto, por questões sócio-económicas ou por inconsciência do que uma eficaz saúde oral representa para o bem-estar, ou mesmo por “receio” de recorrer ao médico dentista, os problemas orais, como é o caso das infeções endodônticas, ainda são prevalentes na população. Quaisquer que sejam as áreas da Medicina Dentária, todas usufruíram um considerável avanço científico na última década despontando a necessidade de cooperação interdisciplinar e a complementaridade entre profissionais de saúde de todas as áreas. Entre os profissionais de saúde estão os farmacêuticos, que contribuem com fármacos e dispositivos médicos indispensáveis para tratamentos dentários, onde se destacam os antibióticos para profilaxia e tratamento de algumas infeções. No entanto, o uso inadequado e abusivo destes fármacos levou ao aparecimento de resistências, que comprometem a eficácia do tratamento o que pode levar a um agravamento do quadro clínico. Em consequência, é importante o uso adequado de agentes antimicrobianos e

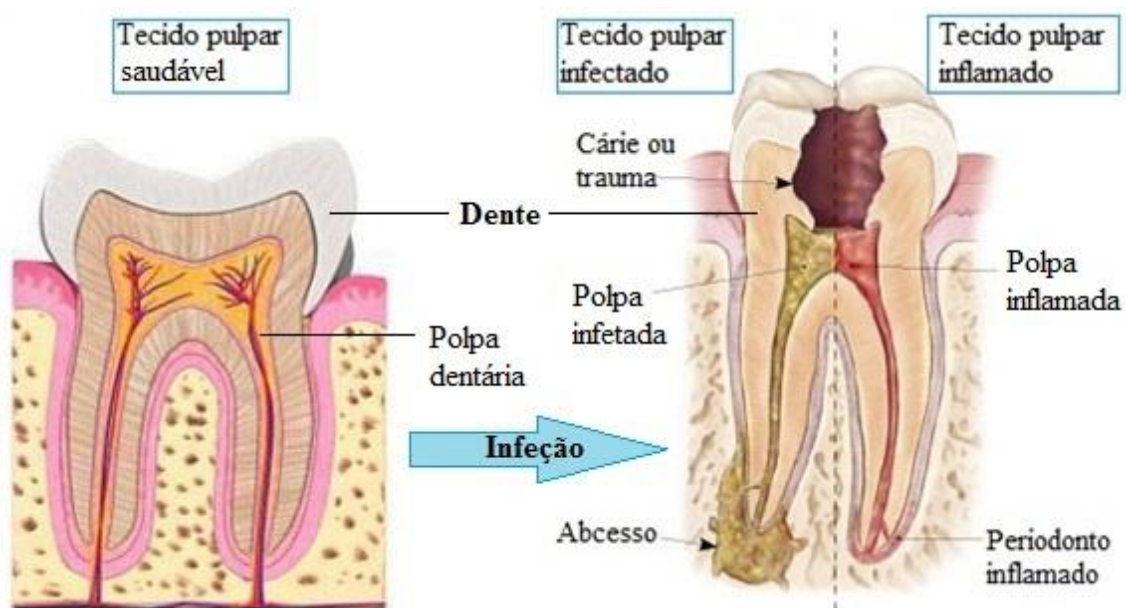
para isso é fundamental o conhecimento das propriedades destes fármacos, o seu potencial, os cuidados a ter e, sobretudo, quais os casos em que o seu uso é apropriado.

Sabe-se que é possível encontrar na cavidade oral vários tipos de microrganismos como “habitantes” comuns desta mucosa. Nesta tese iremos descrever as espécies bacterianas características da microflora oral e quais as estirpes com maior propensão de causar infeção, com especial atenção aos fatores de virulência inerentes. Os microrganismos da flora oral são, muitas vezes, os causadores das infeções endodônticas. Por esse motivo, muitas vezes se recorre a terapêutica antimicrobiana para combater estas infeções. Ao longo deste trabalho foi desenvolvida uma pesquisa sobre os agentes farmacológicos usados para profilaxia e tratamento das infeções endodônticas. Encontram-se aqui descritos os antibióticos mais usados em Medicina Dentária, a família a que pertencem, a sua farmacologia, precauções e a posologia geralmente recomendada a adultos. Também estão descritos os locais alvo de cada agente antimicrobiano descrito em conjunto com o seu espectro de ação. No entanto, é comum o uso inadequado destes fármacos, o que pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos, podendo daí advir um ineficaz combate às infeções orais pela falta de terapêutica efetiva.

O principal objetivo desta tese é a chamada de atenção para a importância da identificação dos genes de resistência comuns em infeções endodônticas. Para esse efeito são debatidos os métodos de transmissão de resistência, seja resistência inerente ou adquirida, os processos de transmissão de genes e os mecanismos de resistência característicos nestes casos. Este trabalho bibliográfico identifica os genes de resistência comuns a infeções desta natureza e qual a sua interferência nas bactérias em que estão presentes.

## I. Introdução

A endodontia é a especialidade da Odontologia que estuda as doenças da polpa dentária e os processos a ela associados. Esta área centra-se na manutenção da polpa dentária em bom estado de saúde e o tratamento da cavidade pulpar (Alves, 2004). Uma infecção endodôntica pode ser resultado de vários fatores, e.g. complicação de uma cárie dentária, trauma dentário ou resultado de fatores químicos e/ou físicos, que originam uma abertura no esmalte permitindo que microrganismos consigam entrar em contacto com a polpa do dente. Uma simples infecção dentária pode-se espalhar da raiz do dente até aos ossos que suportam o dente causando complicações graves (Magazine, 2008; Siqueira Jr, 2002). Como tal, uma infecção endodôntica é caracterizada por um processo inflamatório nos tecidos periodontais resultante da presença de microrganismos no canal radicular do dente, essenciais para a progressão e perpetuação de doenças inflamatórias nos tecidos peri-radulares (Siqueira Jr, 2002).



**Figura 1:** Esquema de um dente saudável e de um dente inflamado/infetado (adaptado de Dentist, 2012; Laboratory).

Quando a polpa dentária é exposta a cáries, desgaste dentário, fraturas/fissuras traumáticas, as bactérias podem invadir e causar a inflamação da polpa. Metabolitos e outros agentes tóxicos produzidos por essas bactérias são considerados os responsáveis pelas ditas reações inflamatórias e posterior desintegração e infecção do espaço da polpa, o que em caso de persistência, pode levar à perda óssea do dente (Chu *et al.*, 2005).

A cavidade oral é um reservatório de flora comensal e adquirida de microrganismos (Sixou *et al.*, 1996). O termo comensal é definido como a relação entre organismos de duas espécies diferentes, onde de uma deriva os nutrientes ou outros benefícios, enquanto a outra permanece ileso (Feng e Weinberg, 2006).

Por esse motivo, independentemente do tipo de tratamento mecânico adotado, nas infecções endodônticas existem casos em que se recomenda o uso de antibióticos como profilaxia ou tratamento. No entanto, o uso indiscriminado deste tipo de terapêutica resulta, diversas vezes, no desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes a esse tipo de medicamentos (Sekiguchi *et al.*, 2007). Nestes casos, a bactéria ganha a capacidade de desenvolver e transmitir genes de resistência, o que retira parte da sua suscetibilidade ao agente antimicrobiano aplicado.

Nas últimas décadas tem-se denotado um grande aumento de bactérias emergentes com resistência a antibióticos, o que se está a tornar um grave problema mundial na área da saúde (Munir *et al.*, 2011).

A resistência a antibióticos é resultante do uso indiscriminado de antibióticos, que leva a que as bactérias desenvolvam mecanismos de resistência e os transmitam para sucessivas linhas celulares, o que resulta no aparecimento de estirpes resistentes.

## II. Cavidade oral

A cavidade oral é revestida por tecidos da membrana mucosa dividida fundamentalmente por duas zonas. O vestíbulo, constituído pelo espaço entre os dentes e o revestimento interno da mucosa dos lábios e bochechas, e os arcos alveolares onde se localizam os dentes.

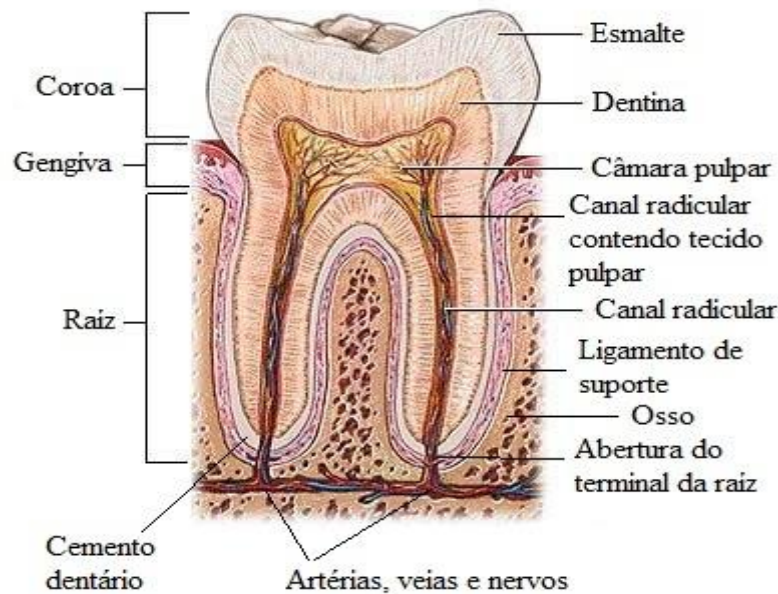
A boca, pela sua anatomia e constituição, proporciona vários habitats para a colonização da cavidade oral regulada por competição inter-bacteriana, suprimento nutricional, e pelo ambiente físico-químico, e.g., pH e temperatura (Sixou *et al.*, 1996).

### II.1. Anatomia do dente

O estudo da anatomia dos dentes remonta ao tempo de Hipócrates, Aristóteles e Galeno, entre outros, por volta de 500 d.C., cujas valiosas contribuições permaneceram intactas por um milénio. Os estudos revolucionários de Andreas Vesalius, nascido a 1514, quebraram as convenções anteriormente estabelecidas abrindo portas para o desenvolvimento de novas pesquisas nesta área (Noble, 2000). Estes mesmos estudos resultaram no conhecimento odontológico dos dias de hoje.

À primeira vista o dente é composto por coroa e raiz. No entanto, ao observar de uma forma mais aprofundada, é possível verificar que o dente possui uma estrutura mais complexa integrada na cavidade oral.

De uma forma geral, o dente tem uma estrutura semelhante à representada pela figura 2:



**Figura 2:** Anatomia do canal radicular (adaptado de A.D.A.M., 2012).

O dente é um tecido vivo, pois é irrigado por uma circulação própria que o alimenta. No seu interior é possível encontrar a polpa dentária que é constituída por tecido estéril, irrigado por um sistema de artérias e veias (Figdor e Gulabivala, 2011).

O ligamento de suporte, ou ligamento periodontal, que reveste o dente é composto por um arranjo de três camadas de veias e artérias, que além do papel de nutrição do dente desempenham um papel mecânico permitindo aceitar as forças exercidas pelo ato de mastigação (Masset *et al.*, 2006).

O esmalte é a substância biológica mais rígida do corpo humano composta por uma mistura de fases mineral e orgânica, sendo uma das suas funções primárias excluir os microrganismos do complexo dentina-polpa (Cuy *et al.*, 2002). Como é possível observar, o dente é bastante semelhante ao osso. De fato, ambos apresentam semelhanças em diversos aspetos, em especial por serem compostos por uma matriz orgânica rica em colagénio tipo I e por cristais mineralizados de hidroxapatite carbonada segregados por odontoblastos e osteoblastos bem diferenciados. No entanto, em

contraste com o osso, a dentina não é remodelada e não se encontra envolvida nos processos metabólicos de regulação de cálcio e fosfato (Opsahl Vital *et al.*, 2012). Cerca de 20% da dentina é composta por túbulos dentários que ligam o complexo dentina-esmalte à polpa. Estes túbulos são responsáveis pelo aumento de resistência da estrutura dentária, além de terem a função de transmissão de estímulos dolorosos resultantes dos danos causados pela cárie.

Dentro do dente está o tecido pulpar com funções de defesa, nutrição, sensorial e de formação dos dentes. Este tecido é constituído por tecido conjuntivo frouxo envolvido por tecidos calcificados, sendo composto por fibras de colagénio, fluído intercelular, fibras nervosas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e substâncias intercelulares (Komabayashi e Zhu, 2010). As infeções endodônticas ocorrem quando as bactérias conseguem aceder a este tecido.

## II.2. Microflora oral

Já se tornou evidente que a diversidade própria da microflora oral é bastante complexa composta por bactérias de várias espécies Gram-positivas e Gram-negativas e também por alguns fungos, destacando-se as bactérias por se encontrarem em muito maior proporção (Siqueira Jr e Sen, 2004; Devine e Marsh, 2009; Sweeney *et al.*, 2004; Lins *et al.*, 2009). Estão na ordem das centenas os microrganismos que colonizam a cavidade oral, podendo variar entre as 300 e as 700 espécies de bactérias, fungos e protozoários (Sweeney *et al.*, 2004; Devine e Marsh, 2009; Lins *et al.*, 2009). Dentro desta amostra, entre 30 a 100 pertencem à flora normal de cada indivíduo (Devine e Marsh, 2009).

Esta amostra varia com a idade, localização anatómica e com os cuidados de higiene do indivíduo (Devine e Marsh, 2009; Nagy, 2010). Algumas das bactérias comensais da microflora oral são, e.g., *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*,

*Haemophilus parainfluenzae*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella oris*, *Prevotella buccae*, *Prevotella oralise* *Neisseriaceae*, *Veillonellaceae*, *spirochaetes*, *Corynebacteria* e *Mycoplasma* (Nagy, 2010; Devine e Marsh, 2009; Sweeney *et al.*, 2004). Também é possível encontrar nesta cavidade bactérias potencialmente patogênicas como, e.g., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, ou membros da família das *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae* e *actinomycetes* e *Lactobacillus paracasei* e *acidophilus* (Sweeney *et al.*, 2004; Narayanan e Vaishnavi, 2010).

Tal diversidade constitui um obstáculo na caracterização da flora microbiana da boca. No entanto, apenas um número limitado de espécies encontram as condições apropriadas para contaminar o canal radicular (Ribeiro *et al.*, 2011). Por vezes, é apenas necessária uma mudança na flora microbiana para o desenvolvimento de cáries e doenças periodontais (Figdor e Gulabivala, 2011).

### III. Infecções da cavidade oral

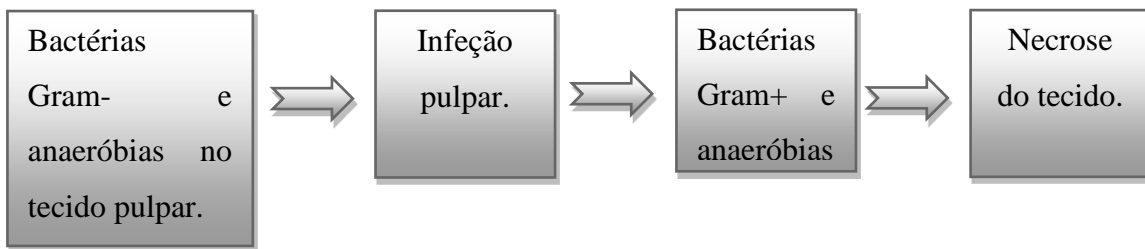
Os problemas da cavidade oral mais frequentes são a cárie e a periodontite, sendo resultantes de uma alteração do equilíbrio da flora normal em conjugação com a propensão do hospedeiro, os processos físico-químicos a que está sujeita e aos hábitos alimentares. No caso das cáries observa-se um aumento de espécies acidogénicas ou ácido-tolerantes, Gram-positivas, principalmente dos géneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Em casos de periodontites há um aumento da massa de placa bacteriana com ampliação de bactérias anaeróbicas obrigatórias e espécies proteolíticas Gram-negativas (Devine e Marsh, 2009). Em casos de inflamação do canal radicular é possível identificar microrganismos como, *e.g.*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, e *Streptococcus* (Chu *et al.*, 2005). Esta informação transmite que a própria microflora oral comum pode ser a causadora de muitas infeções da boca.

Este trabalho está direcionado às doenças endodônticas, e por isso iremos dar mais ênfase a esta área. As doenças endodônticas podem ser classificadas de acordo com a sua localização, *i.e.* infeção intra-radicular e extra-radicular, e pela capacidade de persistência dos microrganismos até entrar no canal radicular, *i.e.* infeção primária, secundária ou persistente (Siqueira Jr e Rôças, 2005b).

#### III.1. Infeções endodônticas

Como já foi aqui mencionado, as infeções endodônticas têm como princípio a invasão bacteriana do tecido pulpar. Tal pode ocorrer por diferentes vias de acesso como: via dos túbulos dentinários (quando há perda de dentina, cárie profunda, fratura coronária); pelo acesso à via periodontal (que ocorre quando as bactérias da bolsa

periodontal profunda penetram através dos canais radiculares); ou pela via hematogénica (circulação sanguínea). Nos casos em que o tecido pulpar está inflamado existe a possibilidade de ocorrer necrose desse tecido, o que, por norma, se inicia com um primeiro contacto das bactérias anaeróbias Gram-negativas com o tecido levando a uma infeção pulpar, que pode ser contaminada por bactérias anaeróbias Gram-positivas, resultando na necrose do tecido pulpar o que, por norma, assume a seguinte sequência (Siqueira Jr e Rôças, 2005b):



**Figura 3:** Esquema representativo do desenvolvimento bacteriano após primeiro contacto com o tecido pulpar.

As infeções primárias são, na sua generalidade, compostas por microrganismos Gram-negativas anaeróbios pertencentes aos géneros e.g., *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, e *Campylobacter* (Siqueira Jr e Rôças, 2005b). Se houver desenvolvimento de uma infeção crónica ou persistente, a flora microbiana prevalente é Gram-positiva aeróbia facultativa, e.g. *Enterococcus faecalis* (Jungermann *et al.*, 2011; Siqueira Jr e Rôças, 2005b). Numa fase inicial, o número de espécies microbianas no canal radicular é normalmente pequeno. Se a causa desta patologia for uma cárie dentária, o processo implica a conjugação simultânea de três fatores fundamentais, i.e., bactérias, uma dieta rica em açúcares e o próprio hospedeiro. Bactérias com capacidade de desenvolver cáries, e.g. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus salivarius*, fermentam os hidratos de carbono, produzindo ácidos orgânicos que acidificam o pH do meio, favorecendo a dissolução e a desmineralização do esmalte (Shen *et al.*, 2004; Jungermann *et al.*, 2011; Almståhl *et al.*, 2010). A saliva, como solução tampão, repõe o pH da cavidade oral em

aproximadamente quarenta minutos, seguindo-se uma fase de remineralização (Eusébio, 2009). Todavia, existem casos em que as bactérias conseguem penetrar para o canal radicular pelos túbulos dentários (casos de trauma sem exposição pulpar), não havendo uma comunicação aparente com a cavidade oral. As bactérias presentes nos canais radiculares podem levar a abscessos, destruição do osso à volta do ápice da raiz, perda dentária, ou mesmo, em alguns casos extremos, podem chegar à corrente sanguínea onde conferem a possibilidade de bactérias de estirpes resistentes se alojarem em vários órgãos, o que pode resultar em patologias como a endocardite bacteriana.

Apesar das condições químicas e físicas serem determinantes para iniciar uma infecção peri-radicular, os agentes microbianos são fundamentais para a progressão e perpetuação das doenças inflamatórias. Estes agentes encontram-se em posições estratégicas em zonas com tecido pulpar necrosado. Nestas situações, os agentes microbianos encontram-se protegidos da ação das células imunitárias do hospedeiro. Por outro lado, os microrganismos localizados na zona apical da raiz estão mais expostos aos agentes de proteção (Siqueira Jr, 2002). A cárie dentária é considerada uma doença infecciosa transmissível (Eusébio, 2009). Estas infeções podem ser classificadas, de uma forma geral, como primárias e secundárias, sendo que as infeções primárias podem dar origem a infeções secundárias ou resistentes na ausência de tratamento adequado.

**Tabela 1:** Infecções endodônticas intra-radulares (adaptado de Siqueira Jr, 2002; Narayanan e Vaishnavi, 2010; Shah e Collins, 1990; Conrads *et al.*, 1997; Rôças *et al.*, 2004; Siqueira Jr e Rôças, 2005b).

<b>Infecções endodônticas intra-radulares primárias</b>
<p><b>Mistura de 3 a 6, e ocasionalmente 12 microrganismos, por canal.</b></p> <p><b>Bactérias Gram-negativas</b>, e.g. <i>Fusobacterium nucleatum</i>, <i>Fusobacterium periodonticum</i>, <i>Porphyromonas endodontalis</i>, <i>Porphyromonas gingivalis</i>, <i>Prevotella intermedia</i>, <i>Prevotella nigrescence</i>, <i>Prevotella tanneriae</i>, <i>Prevotella marshii</i>, <i>Prevotella oralis</i>, <i>Prevotella multissacharivorax</i>, <i>Prevotella baroniae</i>, <i>Prevotella denticola</i>, <i>Tannerella forsythia</i>, <i>Dialister pneumosintes</i>, <i>Dialister invisus</i>, <i>Treponema denticola</i>, <i>Treponema sacranskii</i>, <i>Treponema parvum</i>, <i>Treponema maltophilum</i>, <i>Treponema lecithinolyticum</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Campylobacter rectus</i>, <i>Campylobacter gracilis</i>, <i>Campylobacter curvus</i>.</p> <p><b>Bactérias Gram-positivas</b>, e.g. <i>Peptostreptococcus</i>, <i>Eubacterium spp.</i>, <i>Filifactor alocis</i>, <i>Actinomyces odontolyticus.</i>, <i>Propionibacterium propionicum</i>, <i>Propionibacterium acnes</i>, <i>Olsenella spp.</i>, <i>Slackiaexigua</i>, <i>Mogibacterium timidum</i>, <i>Mogibacterium neglectum</i>, <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>, <i>Streptococcus anginosus</i>, <i>Streptococcus mitis</i>, <i>Streptococcus sanguinis</i>, <i>Streptococcus infantis</i>, <i>Streptococcus parasanguinis</i>, <i>Streptococcus constellatus</i>, <i>Streptococcus intermedius</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Parvimonas micra</i>, <i>Lactococcus garvieae</i>. Clone de <i>Actinomyces sp.</i>, <i>Fusobacterium sp.</i>, <i>Prevotella sp.</i></p>
<b>Infecções endodônticas intra-radulares secundárias ou persistentes</b>
<p><b>Um ou dois agentes microbianos</b></p> <p>É frequente encontrar bactérias Gram-positivas, e.g. <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>, <i>Propionibacterium propionicum</i>, <i>Filifactoralocis</i>, <i>Dialister pneumosintes</i>. Clones relacionados com os géneros <i>Capnocytophaga</i>, <i>Cytophaga</i>, <i>Dialister</i>, <i>Peptostreptococcus</i>, <i>Prevotella</i>, <i>Propionibacterium</i>, <i>Selenomonas</i>, <i>solobacterium</i>, <i>Streptococcuse Veillonella</i>.</p>

A tabela 1 indica os agentes etológicos bacterianos de algumas infecções intraradulares endodônticas. Esta tabela também referencia alguns clones bacterianos como responsáveis por infecções endodônticas. Os clones bacterianos são células geneticamente idênticas que descendem de um ancestral comum. Com o passar do

tempo, podem ocorrer mutações pontuais, recombinações e aquisição ou deleção de elementos móveis que levam à diferenciação entre os membros de um mesmo clone, o que pode levar à aquisição de resistências por parte das bactérias, além de uma extensa diversidade genómica e fenotípica (Rodriguez-Noriega e Seas, 2010). Normalmente, os microrganismos das infeções intra-radulares estão constrictos no canal radicular devido à presença de uma barreira de defesa. Porém, por vezes, as bactérias conseguem ultrapassar esta barreira e disseminar uma infeção extra-radicular. Esta pode desenvolver um abscesso apical agudo com infeção purulenta no tecido periapical. No entanto, as infeções extra-radulares ocorrem independentemente de existir ou não uma infeção intra-radicular. Os microrganismos dominantes nas inflamações deste género são bactérias anaeróbias como, e.g., *Actinomyces spp*, *Propionibacterium propionicum*, *Treponema spp*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema forsythia*, *Prevotella spp* e *Fusobacterium nucleatum* (Narayanan e Vaishnavi, 2010; Sunde *et al.*, 2000; Sunde *et al.*, 2002; Gatti *et al.*, 2000). É preciso ter em conta que a lista de microrganismos que estão envolvidos em doenças da boca está em contínua expansão e tem tendência a se tornar cada vez mais específica ao longo dos tempos (Siqueira Jr, 2002). Tal resulta do incessante desenvolvimento de pesquisas nesta área ao longo dos tempos.

Todavia, é de salientar a importância do controlo microbiano nas infeções endodônticas para o sucesso do tratamento endodôntico (Silva *et al.*, 2010).

### III.2. Vias de Infeção

Como já foi referido neste trabalho a presença de agentes bacterianos é determinante para o desenvolvimento de uma infeção endodôntica. Como o interior da estrutura dentária é asséptica, para haver uma infeção endodôntica é necessário que haja a contaminação destes tecidos, o que pode acontecer por diferentes vias, nomeadamente: pelos túbulos dentários na polpa exposta por traumatismo ou fratura; pela membrana periodontal (atravessa a abertura na cavidade da raiz); através da

corrente sanguínea (bacteriemia com anacorese); por uma restauração inadequada do dente; ou nos casos em que um dente com infecção endodôntica transmite os microrganismos a um dente adjacente saudável (Narayanan e Vaishnavi, 2010; Torabinejad *et al.*, 1990; Torabinejad *et al.*, 2005). Porém, apesar de qualquer microrganismo ser capaz de atingir a polpa dentária por estas vias, apenas as bactérias com alguma capacidade de virulência é que são capazes de provocar uma infecção endodôntica. Estes microrganismos possuem a capacidade de se organizarem em biofilmes. Para tal é necessário que os microrganismos reúnam quatro condições: capacidade de auto-organização (autopoiese); ser resistente a alterações do ambiente (homeostase); com maior aptidão de viver em comunidade do que isolado (sinergia); e aptidão de responder a alterações ambientais como uma unidade e não como um indivíduo (Narayanan e Vaishnavi, 2010).

É importante salientar que muitas das bactérias possuem fatores de virulência que irão influenciar o grau de gravidade da infecção bacteriana.

### **III.3.Fatores de virulência**

Os fatores de virulência são determinantes para a patogenicidade dos microrganismos (Wu *et al.*, 2008). Considera-se fator de virulência a propriedade que potencia a competência das bactérias em infetar e causar uma doença, além de aumentar a sua capacidade de sobrevivência em ambientes hostis (Chen *et al.*, 2012). Os fatores de virulência podem ser divididos com base no mecanismo de virulência e sua função (Wu *et al.*, 2008). Estes grupos de fatores de virulência encontram-se descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Mecanismos de virulência de algumas classes de fatores de virulência (adaptado de Wu *et al.*, 2008).

Classe	Mecanismo de virulência
<b>Proteínas de membrana</b>	Adesão, colonização e invasão. Promove a aderência na superfície da célula hospedeira, responsável pela resistência a antibióticos e promove comunicação intercelular.
<b>Cápsulas polissacarídeas</b>	Envolvem a bactéria conferindo-lhe propriedades anti-fagocitárias.
<b>Proteínas de secreção</b>	Toxinas que conseguem modificar o ambiente celular da bactéria hospedeira e criar interações entre a bactéria e a célula hospedeira. As bactérias possuem sistemas de secreção distintos para transportar as toxinas proteicas do seu citoplasma para o hospedeiro ou matriz extracelular.
<b>Parede celular e outros componentes de membrana</b>	As bactérias Gram-positivas são naturalmente envolvidas por uma parede celular grossa com reduzida permeabilidade ao ambiente externo.

Elementos como os lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano (PG), ácido lipoteicóico (LTA), fímbrias, cápsulas, vesículas extracelulares, exotoxinas, proteínas extracelulares, ácidos gordos de cadeia curta, poliaminas e aniões superóxido são classificados como fatores de virulência (Narayanan e Vaishnavi, 2010; Khabbaz *et al.*, 2001; Schein e Schilder, 2006; Jacinto *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2000; Hogg *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2004; Beveridge, 1999; Kinder e Holt, 1989; Kuehn e Kesty, 2005; Tomita *et al.*, 1997; Sundqvist *et al.*, 1985; Niederman *et al.*, 1997; Kurita-Ochiai *et al.*, 2006; Thomas e Thomas, 2001; Jansen e Yu, 2006; Frank e Barbour, 2006; Valero *et al.*, 2003).

Existem fatores de virulência que possuem uma ação mais específica nos processos de inflamação e nas infecções endodônticas.

Mais concretamente, a endotoxina LPS, presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, protege o microrganismo contra lise e induz processos de

inflamação no hospedeiro (Wu *et al.*, 2008; Schein e Schilder, 2006; Narayanan e Vaishnavi, 2010). O LPS reduz os mecanismos de imunovigilância na polpa. Estas endotoxinas estão associadas à dor na polpa, inflamação periapical, ativação do complemento e destruição do osso periapical (Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2008; Narayanan e Vaishnavi, 2010).

O LTA está presente nas bactérias Gram-positivas e tem uma ação patogénica semelhante ao LPS. Este é libertado durante a lise celular, ligando-se às células-alvo, onde interage com anticorpos circulantes e ativa a cascata do complemento causando dano (Narayanan e Vaishnavi, 2010; Hogg *et al.*, 1997).

O PG é o componente principal da parede celular das bactérias Gram-positivas. Após lise celular, o PG é libertado onde pode reagir com o sistema imune inato, podendo também induzir a supra-regulação das citocinas proinflatórias e anti-inflatórias nas células T. A ação do PG é potenciada pela presença de LPS (Wang *et al.*, 2000; Narayanan e Vaishnavi, 2010). Por sua vez, as poliaminas, pequenas moléculas policatiónicas (e.g. putrescina, cadaverina, espermidina, e espermina) que contribuem para o aparecimento dos sintomas clínicos como a dor e formação de fístulas (Narayanan e Vaishnavi, 2010; Thomas e Thomas, 2001).

#### **IV. Métodos de identificação e caracterização dos agentes etiológicos das infecções endodônticas**

Para qualquer tipo de tratamento, é fundamental o conhecimento dos fatores etiológicos e fisiopatológicos do processo que desencadeia a doença como base de qualquer tratamento clínico, o que permite a escolha racional do tratamento mais apropriado. Como as doenças endodônticas são sobretudo de etiologia infecciosa é fundamental a pesquisa das espécies envolvidas na patogênese destas doenças (Siqueira Jr e Rôças, 2003).

Inicialmente, a maior parte das técnicas disponíveis para a identificação e caracterização das bactérias necessitavam de se proceder ao cultivo de microrganismos em laboratório. Este processo requer um conhecimento profundo dos requisitos para o seu crescimento, contudo ainda não se entende completamente todos os fatores de crescimento requeridos pelos inúmeros microrganismos para sobreviver nos diversos habitats, inclusive o corpo humano. Algumas espécies de microrganismos são difíceis de trabalhar em laboratório, pois alguns são fastidiosos ou mesmo não cultiváveis, o que constitui uma grande limitação (Siqueira Jr e Rôças, 2005a; Siqueira Jr e Rôças, 2003). Das bactérias conhecidas como pertencentes à microflora oral, apenas cerca de 50% é cultivável em laboratório, dificultando o seu estudo. Existem vários motivos que levam, a que amostras de bactérias possam não demonstrar crescimento em cultura, tais como: falta de nutrientes necessários ao crescimento no meio de cultura; o próprio meio de cultura pode ser tóxico; bactérias presentes na amostra podem produzir substâncias inibitórias ao crescimento da bactéria alvo; as bactérias podem depender umas das outras para o seu crescimento; o rompimento das redes de citoquinas bacterianas e consequentemente a perda da intercomunicação pela separação das bactérias em meio sólido (Wade, 2002).

Assim, para contornar este problema, atualmente recorre-se com frequência a métodos de biologia molecular pois estes não necessitam do cultivo dos microrganismos para se proceder à sua identificação e caracterização.

## IV.1. Métodos Moleculares

As técnicas moleculares possuem aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas. É possível assumir que os métodos que têm por base identificar as características genotípicas das bactérias fornecem informação mais credível para a caracterização e identificação dos agentes infecciosos. Outro fator importante das técnicas moleculares é que estas podem ser aplicadas de forma direta nos espécimes clínicos sem a necessidade de induzir o crescimento e isolamento dos microrganismos, o que é uma mais-valia em odontologia pelas limitações apresentadas no cultivo das bactérias da microflora oral (Siqueira Jr e Rôças, 2003).

Nos dias de hoje estão disponíveis variadas técnicas que permitem a análise do ADN. A amplificação de ácidos nucleicos possibilitou ultrapassar algumas etapas na detecção e caracterização microbiana, não sendo mais necessário o seu crescimento em laboratório para possibilitar a sua identificação. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e outras técnicas de amplificação recentemente desenvolvidas, permitiram a amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* de forma simples e rápida, com acréscimo na sensibilidade e especificidade (Tang *et al.*, 1997; Valarini *et al.*, 2011). De uma forma resumida, algumas das técnicas mais relevantes na área da odontologia são: extração e purificação dos ácidos nucleicos, eletroforese, PCR e microarrays de ADN (Valarini *et al.*, 2011).

Para se realizar os estudos genéticos é necessário a obtenção dos ácidos nucleicos íntegros e livres de contaminantes que possam entrar em conflito com os testes moleculares, sendo assim importante o processo de extração e purificação de ácidos nucleicos, para o qual existem vários métodos descritos (Valarini *et al.*, 2011). A extração de material genético pode envolver a extração celular ou lise direta, dependendo se as células estão ou não isoladas da sua matriz (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001). A lise é normalmente realizada por meio de processo enzimático suave para não prejudicar a integridade do material genético. Após a lise celular procede-se à extração dos fragmentos celulares e sua separação dos ácidos nucleicos. De seguida é necessário

realizar uma precipitação alcoólica para isolar o ADN ou ARN (Valarini *et al.*, 2011; Roose-Amsaleg *et al.*, 2001).

A partir deste ponto é possível usar os ácidos nucleicos em técnicas de identificação molecular.

A eletroforese de ácidos nucleicos baseia-se na separação de moléculas de ADN ou ARN de acordo com o seu tamanho (Shendruk *et al.*, 2012). O ADN é digerido por enzimas de restrição dando origem a fragmentos que são aplicados numa matriz, e.g. gel de agarose, de pH neutro sendo posteriormente submetidos a um campo elétrico. Sob a ação deste campo elétrico, os fragmentos de ácidos nucleicos irão migrar do cátodo para o ânodo. Este processo leva à separação dos fragmentos de ADN pelo gel segundo o seu peso molecular, onde quanto menor for o peso molecular (PM) dos fragmentos de ADN maior é a distância por eles percorrida. Em simultâneo, aplica-se no gel um marcador de PM (no caso do ADN é, por norma, usado ADN de fago lambda que é digerido com a enzima de restrição HindIII), que serve como ponto de referência de fragmentos de ADN de diferentes tamanhos. Após a corrida é possível corar o ADN no gel de agarose com brometo de etídio o que permite a sua visualização sob luz ultravioleta (Valarini *et al.*, 2011; Bernier *et al.*, 2004).

A técnica de PCR foi desenvolvida em 1983 pelo cientista Kary Mullis, sendo uma das técnicas mais utilizadas atualmente. Esta técnica veio revolucionar a biologia molecular, bem como acelerar a investigação médica e biológica no estudo dos genes e genoma (Siqueira Jr e Rôças, 2005a; Valarini *et al.*, 2011; Siqueira Jr e Rôças, 2003).

O PCR permite, através do uso de pequenas quantidades de ADN ou ARN, amplificar, por ação de polimerases, uma dada região dessa molécula delimitada pelos *primers* utilizados, até à obtenção de uma série de cópias da sequência alvo. A sua prática consiste na mistura, em tubo de ensaio, de uma pequena quantidade de ADN genómico, desoxiribonucleósidos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP e dGTP que compõem a molécula de ADN), a enzima Taq ADN polimerase (enzima termoestável), oligonucleótidos iniciadores ou *primers* e uma solução tampão para fornecer o ambiente ideal de pH e salinidade. Este mesmo tubo é colocado num aparelho denominado termociclador, sujeitando a amostra a ciclos de três etapas: desnaturaçã

amostra é submetida à temperatura de 94°C por 5 minutos induzindo a separação das cadeias de ADN), emparelhamento dos *primers* (realizada entre 30-65°C por 30 segundos, para que os *primers* se liguem às sequências complementares do ADN) e síntese (submete-se a amostra a uma temperatura de 72°C, entre 2 a 5 minutos, para que a Taq ADN polimerase consiga atuar, sintetizando uma nova cadeia). Estes passos são repetidos por 25 a 30 ciclos podendo formar milhões de cópias de ADN (Valarini *et al.*, 2011; Siqueira Jr e Rôças, 2005a). O desenvolvimento da técnica de amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos por PCR conseguiu colmatar os obstáculos das análises efetuadas com pequenos fragmentos ou pequenas quantidades de ADN e permitir a rápida identificação de microrganismos, sendo uma mais-valia para a identificação e classificação de bactérias. Esta técnica é muito usada na identificação de agentes patogénicos associados à cárie, placa bacteriana e doença periodontal (Valarini *et al.*, 2011; Siqueira Jr e Rôças, 2003). Existem variantes da técnica de PCR, e.g. PCR em tempo real, amplificação Alelo Oligonucleótidos-Específica (PCR-ASO), reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* arbitrários (AP-PCR) (Valarini *et al.*, 2011).

A técnica de *microarrays* de ADN é um método de alta performance que permite avaliar a expressão diferencial de milhares de genes em apenas um ensaio. Esta técnica consiste na fixação de sondas de múltiplos genes em lâminas de vidro ou membranas de nylon, denominados por *ships* biológicos ou *bioships*. Estes são submetidos a leitores de laser ou leitores de fósforo dando origem a uma imagem de hibridação, com a finalidade de medir os níveis de expressão genética transcrita em larga escala, analisando o perfil do transcriptoma (Valarini *et al.*, 2011).

Todos estes métodos permitem identificar com alguma sensibilidade os genes de resistência a antibióticos presentes nas bactérias resistentes.

## V. Farmacoterapia em endodontia

Por norma, dependendo de cada caso, recorre-se a alguns procedimentos mecânicos para o tratamento das infeções endodônticas. No tratamento dos canais radiculares, o próprio preparo biomecânico reduz de forma drástica o número de microrganismos da infeção endodôntica. Porém, existem alguns lugares a que os instrumentos não conseguem aceder, o que torna pertinente o uso de fármacos para promover a redução da população bacteriana na boca de forma a ajudar a reduzir a infeção (Silva *et al.*, 2010).

Durante o tratamento biomecânico podem ser usadas algumas soluções tópicas que promovem a redução da população bacteriana, e.g. solução de cloroexidina, hidróxido de cálcio ou de hidróxido de sódio (Bonan *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2010). Estas soluções irrigadoras além de reduzirem o número de bactérias promovendo a uma desinfecção, conseguem dissolver os tecidos orgânicos remanescentes e promover a lubrificação do local durante o tratamento sem causar irritação dos tecidos biológicos (Bonan *et al.*, 2011).

O hidróxido de sódio tem um papel de relevo na endodontia por estimular a formação de tecido duro e pelas suas características antimicrobianas. Este composto consegue estabelecer um pH alcalino (por volta de 12,5) inóspito para a maioria dos microrganismos, além de neutralizar os LPS o que auxilia na limpeza dos canais radiculares (Silva *et al.*, 2010).

A solução de cloroexidina (em forma de sal, gluconato, acetato ou hipoclorito) é um agente antimicrobiano de largo espectro com capacidade de ficar adsorvido na dentina. Este agente adsorve à parede celular das bactérias, danificando-a, o que leva ao despejo dos componentes intracelulares bacterianos (Bonan *et al.*, 2011).

A solução de hidróxido de sódio foi muito usada durante décadas pela sua ação antimicrobiana de largo espectro e ainda como solvente inorgânico. Por outro lado, esta substância tem uma ação citotóxica além de sabor e odor desagradáveis (Bonan *et al.*, 2011).

Por vezes é necessário recorrer a medicamentos de uso sistémico em endodontia. É comum o uso de anti-inflamatórios e analgésicos para melhorar o conforto do doente. No entanto, o uso de agentes antimicrobianos sistémicos, como os antibióticos, é fundamental para assegurar a eliminação do agente etiológico da infeção, acelerando o processo de cura. Por estes motivos os antibióticos são prescritos como adjuvantes no tratamento de infeções endodônticas (Baumgartner e Xia, 2003).

### **V.1. Antibióticos de uso sistémico**

Antes da descoberta dos antibióticos as doenças microbianas eram a principal causa de morte na população mundial (Sousa, 2006). A descoberta de agentes antibacterianos representa uma das mais importantes conquistas farmacológicas da humanidade no século XX. Desde a introdução da penicilina G por Sir Alexander Fleming em 1928, estes fármacos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas, sobretudo entre as décadas de 50 e 90, em que novas descobertas impulsionaram o desenvolvimento de diversas moléculas com atividade antimicrobiana (Al-Haroni, 2008; Sousa, 2006).

Os antibióticos devem ter um tropismo para a bactéria de forma a não prejudicar células humanas ou de outros microrganismos. Desta forma, os antibióticos antibacterianos interagem apenas nas células procariotas, nos seus respetivos alvos, executando uma atividade bactericida (mata a bactéria) ou bacteriostática (impede a multiplicação bacteriana para facilitar a sua eliminação pelo sistema imune do hospedeiro) (Sousa, 2006). Por norma, o tipo de ação que o agente antibacteriano possui depende da concentração usada. Em pequenas concentrações a molécula de antibiótico tem, frequentemente, ação bacteriostática. Por sua vez, em quantidades elevadas, o antibiótico possui atividade bactericida, sendo necessário manter este fármaco em concentrações suficientemente altas no local alvo para exercer a sua ação (Cloete, 2003).

Em endodontia o uso de agentes antimicrobianos é indicado no tratamento de abscessos periapicais agudos acompanhados de sinais e sintomatologia sistêmica (e.g. dor severa, febre e mal-estar geral), profilaxia da infecção associada à avulsão dentária, tratamento da sintomatologia e/ou exsudação persistentes após a conclusão de todas as medidas disponíveis para o controlo da infecção intra-radicular e profilaxia face à possível bacteriemia decorrente do tratamento endodôntico em pacientes imunologicamente debilitados ou em pacientes suscetíveis a endocardite bacteriana (Oliveira e Uzeda, 2010).

O agente antibacteriano ideal é aquele que interfere na função vital da bactéria sem comprometer a célula do hospedeiro, além de ter uma boa distribuição pelos tecidos e fluídos orgânicos, sem sofrer destruição enzimática nem causar reações alérgicas, irritativas ou tóxicas ao hospedeiro e, sobretudo, não induzir o desenvolvimento de bactérias resistentes. É muito importante escolher um antibiótico de pequeno espectro, específico para o agente etiológico da infecção, para evitar prejudicar a microflora comensal da mucosa. Fundamentalmente, a escolha deste fármaco baseia-se em pesquisas realizadas com base em testes de suscetibilidade ou antibiogramas (testes que determinam o padrão bacteriano de resistência a um número de antibióticos) (Baumgartner e Xia, 2003; Ferreira e Sousa, 1998). Uma forma de se realizar estes testes é pela utilização do método de difusão dos discos em agar. O resultado é medido ao fim de 18 a 24 horas, e após a medição dos halos de inibição e a leitura correta pelas Normas CLSI, chega-se às conclusões de resistência ou suscetibilidade da espécie aos antibióticos em estudo.

São inúmeras as bactérias que habitam no organismo e no meio ambiente, e nem todas apresentam as mesmas características. Como tal, surgiu a necessidade da criação de moléculas de antibióticos com diferentes mecanismos de ação antibacteriana. Ao longo das décadas desenvolveram-se inúmeras moléculas que, conforme as suas características estruturais e mecanismos de ação, foram distribuídas em diferentes classes, e.g.  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas, sulfamidas (Sousa, 2001; Sousa, 2006). No entanto, apesar da grande variedade de agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, apenas um

pequeno grupo é usado em problemas endodônticos. Dentro desta lista destacam-se os fármacos das classes dos  $\beta$ -lactâmicos, por serem os mais usados por todo o mundo.

Na tabela 3 encontram-se os antibióticos mais usados em endodontia, em conjunto com a sua classificação, características, precauções e principais propriedades farmacológicas:

**Tabela 3:** Antibióticos mais usados em infeções endodônticas (adaptado de Sousa, 2006; Infarmed; Sousa, 2001; Al-Haroni, 2008; Sweeney *et al.*, 2004).

Propriedades Antibiótico	Classe   Características   Ação   Farmacocinética   Administração
<b>Amoxicilina</b>	Penicilina   Penicilina semissintética ( <i>p</i> -hidroxipenicilina) de largo espectro suscetível às $\beta$ -lactamases   Antibiótico antiparietal   Boa absorção oral (Cerca de 80% é absorvida por esta via). A % de absorção é independente da dose administrada quando esta é inferior a 3 g/adulto. Picos séricos são obtidos 1 a 2 horas após ingestão das cápsulas. Boa penetração nas gengivas. Tempo de semivida de 0,7-1,4 horas.   Administração por via oral: 250 a 500 mg de 8 em 8 horas; 1 g de 12 em 12 horas a administrar 1 hora antes de intervenções cirúrgicas ou extrações dentárias, na profilaxia da endocardite bacteriana.
<b>Amoxicilina + Ácido Clavulânico</b>	Penicilina   Penicilina semissintética ( <i>p</i> -hidroxipenicilina) de largo espectro suscetível às $\beta$ -lactamases + inibidor das $\beta$ -lactamases.   Antibiótico antiparietal   Em tudo semelhante à amoxicilina exceto no tempo de semivida. O ácido clavulânico inibe a ação das $\beta$ -lactamases o que, em associação com a amoxicilina, aumenta o seu tempo de semivida.   Administração por via oral: Amoxicilina (500 mg) + ácido clavulânico (125 mg) → 1 dose de 8 em 8 horas ao dia. Amoxicilina (875 mg) + ácido clavulânico (125 mg) → 1 dose de 12 em 12 horas ao dia.

<b>Propriedades Antibiótico</b>	<b>Classe   Características   Ação   Farmacocinética   Administração</b>
<b>Ampicilina</b>	Penicilina   Penicilina semissintética (alfa-aminobenzilpenicilina) de largo espectro   Antibiótico antiparietal   Estáveis em meio ácido o que possibilita a sua administração oral. Fraca absorção oral (30-55%) com o pico máximo de concentração sérica ao fim de 2 horas de ingestão. Tem um tempo de semivida de 60 minutos e com fraca ligação proteica (15-25%). Distribui-se bem pelos tecidos e fluidos do organismo. Atinge altas concentrações na bÍlis   Administração por via oral: 250 mg a 1 g de 6 em 6 horas 30 minutos antes das refeições.
<b>Azitromicina</b>	Macrólido   Macrólido de 15 átomos no anel lactónico, derivado semissintético da eritromicina A (azalido)   Antibiótico Bacteriostático   Boa estabilidade aos ácidos gástricos e boa absorção oral. Aconselha-se o seu uso com o estômago vazio (melhor absorvido nestas condições). Tempo de semivida elevado. Não afeta as concentrações plasmáticas da teofilina e da varfarina após administração de uma única dose. É contraindicado em casos de disfunção hepática. A administração de doses múltiplas pode aumentar o risco de toxicidade induzida pela teofilina ou varfarina   Administração por via oral: Apenas 1 vez ao dia (500 mg de 24 em 24 horas por 3 dias).
<b>Cefaclor</b>	Cefalosporina   Cefalosporina de 2ª geração. Cefalosporina semissintética (mono-hidrato do ácido-3-cloro-7-D-(2-fenilglicinamida)-3-cefemo-4-carboxílico)   Antibiótico antiparietal   Absorvida oralmente, não afetada pela ingestão de alimentos   Administração por via oral: 250 a 500 mg de 8 em 8 horas. Até 4 g por dia nas infeções graves.

<b>Propriedades Antibiótico</b>	<b>Classe   Características   Ação   Farmacocinética   Administração</b>
<b>Cefalexina</b>	Cefalosporina   Cefalosporina de 1ª geração. Cefalosporina semissintética (alfa-amino-fenilacetamido-cefemo)   Antibiótico antiparietal e bactericida Boa absorção no tubo digestivo. A sua absorção oral é afetada pela ingestão de alimentos   Administração por via oral: Doses de 500-1000 mg podem ser administradas de 12 em 12 horas.
<b>Clarithromicina</b>	Macrólido   Macrólido de 14 átomos no anel lactónico. É um derivado semissintético da eritromicina A (6- <i>o</i> -metil-eritromicina)   Antibiótico Bacteriostático   Ação semelhante à eritromicina, com o detalhe de exibir maior estabilidade no suco gástrico e melhor absorção que a eritromicina A. É contraindicado na gravidez e aleitamento e disfunção hepática   Administração por via oral: 250 mg usadas de 12 em 12 horas; 500 mg de 12 em 12 horas (em infeções graves).
<b>Clindamicina</b>	Lincosamidas   Derivado semissintético da lincomicina (7-cloro-7-desoxilincomicina)   Antibiótico antiparietal   Absorvida quase na totalidade pela via oral, onde atinge os seus picos séricos de 45 a 60 minutos após sua administração. A clindamicina difunde bem nos tecidos e fluidos corporais, com concentrações significativas no tecido ósseo, saliva, líquido pleural, sinovial, biliar e humor aquoso. Contraindicado em gravidez, aleitamento e doença hepática   Administração por via oral: Doses de 150 a 300 mg de 6 em 6 horas.

<b>Propriedades Antibiótico</b>	<b>Classe   Características   Ação   Farmacocinética   Administração</b>
<b>Eritromicina</b>	Macrólidos   Deriva de uma mistura de 6 componentes (A a F) por <i>Saccharopolyspora erythraea</i> . Base fraca com uma geninamacrolídica de 14 átomos ligada a 2 açúcares (L-cladinose e desoxamina)   Antibiótico Bacteriostático   Molécula inativada pela acidez gástrica. Absorção oral é maior com estômago vazio. A eritromicina aumenta as concentrações séricas, com potencial desenvolvimento de toxicidade, da carbamazepina, teofilina, digoxina, ciclosporina, astemizol e terfenadina. É contraindicado em disfunção hepática   Administração por via oral: De 250 a 500 mg de 6 em 6 horas ou de 500 g a 1g de 12 em 12 horas.
<b>Metronidazol</b>	5-nitroimidazol   Principal composto da família 5-nitroimidazol. Derivado heterocíclico com um núcleo de 5 átomos e com radical 5-NO <sub>2</sub>   Antibiótico Bactericida   Bem absorvidos pela via oral (cerca de 90%). O seu pico máximo de concentração sanguínea ao fim de 1-2 horas após a sua administração. Ingestão com alimentos atrasa a sua absorção. Inibe o metabolismo dos anticoagulantes orais e da fenitoína. O fenobarbital e a cimetidina podem comprometer a sua eficácia terapêutica (a sua coadministração acarreta o risco de reações tipo dissulfiram). É contraindicado em caso de gravidez e aleitamento   Administração por via oral: De 250 a 500 mg de 8 em 8 horas.
<b>Penicilina V ou fenoximetilpenicilina</b>	Penicilina   Antibiótico $\beta$ -lactâmico. É o alfa-fenoximetilpenicilina.   Antibiótico antiparietal   É fracamente absorvido no tubo digestivo, sendo 1/3 da dose absorvida pelo duodeno. É rapidamente absorvida <i>per os</i> atingindo o seu pico sérico em 30 a 60 minutos após a sua administração. A absorção oral atinge cerca de 60-73% da dose administrada   Administração por via oral: Doses de 125 a 500 mg, 2 a 4 vezes/dia em adultos.

Propriedades Antibiótico	Classe   Características   Ação   Farmacocinética   Administração
<b>Tetraciclina</b>	Tetraciclina   Antibiótico com núcleo hidroxi-naftaceno formado por um núcleo de 4 anéis benzênicos fundidos   Antibiótico Bacteriostático   A tetraciclina é absorvida no trato gastrointestinal, cuja absorção é prejudicada por, e.g. ingestão de alimentos, catiões di e trivalentes, antiácidos, produtos derivados leite e com ferro. A absorção da molécula base ou do cloridrato de tetraciclina (75-80 %) ocorre no estômago e intestino delgado, sobretudo de estômago vazio, e é eliminada pelo fígado (circulação enterohepática), fezes e urina. As tetraciclina podem causar intolerância gástrica, náuseas e vômitos. É uma molécula nefrotóxica (atenção aos casos de insuficiência renal), pode aumentar a pressão intracraniana em crianças e adultos (acompanhado de dores de cabeça, náuseas e vômitos), apresenta fotossensibilidade acumulando-se na pele, deposita-se nos dentes e ossos (provoca uma coloração dos dentes e impede a formação óssea), é contraindicado a grávidas. Esta molécula não deve ser usada em associação com $\beta$ -lactâmicos (antagonismo antibacteriano). Reduz o efeito de contraceptivos   Administração por via oral: 500 mg de 12 em 12 horas ou 250 mg de 8 em 8 horas.

A tabela 3 indica que grande parte dos antibióticos usados em endodontia pertence sobretudo ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, seguido dos macrólidos, havendo também antibióticos do grupo das lincosamidas, 5-nitroimidazol e tetraciclina. De fato, os antibióticos mais usados em medicina convencional são os  $\beta$ -lactâmicos (Al-Haroni, 2008; Pitout *et al.*, 1997). As moléculas desta família têm essa denominação, pois exibem um anel  $\beta$ -lactâmico comum a todas, formado por 3 átomos de carbono e um de nitrogênio com radicais substituintes, no qual se encontra incorporado um anel tiazolidina nas penicilinas ou um anel di-hidrotiazina nas cefalosporinas (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Os macrólidos estão representados pela azitromicina, claritromicina e pela eritromicina. Estas moléculas são lactonas macrocíclicas, classificadas segundo o número de átomos (14, 15, 16 átomos) no anel lactónico e são produzidas por *Streptomyces* sp e *Micromonospora* sp (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

A clindamicina pertence à família das lincosamidas que são antibióticos sulfurados isolados de *Streptomyces lincolnensis*, cuja modificação química originou este antibiótico. O metronidazol é a molécula principal da família 5-nitroimidazol, sendo um derivado heterocíclico ligado a um radical 5-NO<sub>2</sub>. Por fim, a tetraciclina, que pertence à família com nome homónimo, possui um núcleo hidroxinaftaceno, formado pela fusão de 4 anéis benzénicos ligados entre si, o que deu origem ao seu nome. A molécula original, a clorotetraciclina, foi obtida a partir de culturas de *Streptomyces aureofaciens* (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Estes antibióticos são usados conforme o caso clínico em que se enquadra o doente. Por exemplo, normalmente é recomendada a administração profilática de antibióticos antes de procedimentos cirúrgicos (uma hora antes da operação), numa única toma, amoxicilina (2 g em adultos, 50 mg/kg em crianças) ou, em caso de alergia ou intolerância a β-lactâmicos, clindamicina (600 mg em adultos, 20 mg/kg em crianças com idade acima dos 6 anos) (Dumarcet, 2012).

Por vezes surgem casos de hipersensibilidade a alguns antibióticos sendo necessário recorrer a moléculas alternativas. Um destes casos é a eritromicina que é um antibiótico muito usado em infeções endodônticas, em alternativa aos antibióticos β-lactâmicos para o tratamento de abscessos (Roe *et al.*, 1996).

## V.2. Mecanismos de ação dos antibióticos

Como já foi mencionado, é fundamental que o funcionamento do agente antibacteriano seja seletivo para a bactéria, reduzindo ao máximo o risco de prejudicar o

hospedeiro, o que é facilitado pelas diferenças estruturais existentes entre as bactérias e os seres humanos. Entre as suas diferenças é de destacar a presença de ribossomas bacterianos 70S, parede celular de peptidoglicano e a existência de um único cromossoma disperso no citosol bacteriano (isento de membrana nuclear). Assim, a sua ação pode ocorrer ao nível da parede celular, da membrana citoplasmática, dos ribossomas, do ADN ou no metabolismo das células bacterianas (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Como se pode verificar, a ação dos antibióticos referenciados é distinta e varia conforme a classe, o que vai determinar o seu mecanismo de ação. Tal significa que cada classe de antibiótico vai atuar num determinado local da bactéria para exercer a sua ação. Existem três eventos fundamentais na reprodução bacteriana, i.e.: (a) Replicação da molécula de ADN onde participam enzimas como a ADN polimerase e ADN girase; (b) Transcrição, ou síntese de ARN, catalisada pela enzima ARN polimerase; e (c) Tradução ou síntese proteica, que ocorre em ribossomas (constituídos por uma subunidade 30S e outra 50S). As proteínas produzidas podem ter atividade catalítica como enzimas, função estrutural como proteínas de membrana, ou capacidade reguladora de proteínas como por exemplo serem repressores. Durante estas etapas o antibiótico pode ter uma ação inibidora do crescimento celular (Silva, 1996). Os mecanismos de ação de cada uma das classes de antibióticos referentes à tabela 3 estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4:** Mecanismo de ação de cada uma das classes de antibióticos mais usados em endodontia (adaptado de La-Scalea *et al.*, 1999; Sousa, 2001; Sousa, 2006; Guimarães *et al.*, 2010; Al-Haroni, 2008).

Classe de antibiótico	Alvo	Mecanismo de ação
<b>β-lactâmicos</b>	Enzima transpeptidase	Inibição da formação das ligações cruzadas entre as cadeias de peptidoglicano, o que impede a formação correta da parede celular bacteriana.

Classe de antibiótico	Alvo	Mecanismo de ação
Macrólidos e lincosamidas	Subunidade 50s do ribossoma	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Tetraciclina	Subunidade 30s do ribossoma	Impede a ligação codão-anticodão.
5-nitroimidazol	ADN bacteriano	Pró-fármaco ativado por ação de nitrorredutases. Inibição da síntese do ácido desoxirribonucleico e degradação do ADN.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos possuem uma ação antiparietal em bactérias aeróbicas Gram-positivas, anaeróbicas Gram-positivas e anaeróbicas Gram-negativas. Estes inibem a formação da ligação peptídica e a fase terminal da biossíntese do peptoglicano, constituinte da parede bacteriana. A ação destes antibióticos baseia-se na inativação das enzimas mediadoras da biossíntese do peptidoglicano, i.e., transpeptidases e carboxipeptidases, também conhecidas por PBP's (*Penicilin-Binding-Proteins*) por funcionarem como alvo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Resumindo, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e.g. amoxicilina, fenoximetilpenicilina (ou penicilina V), ampicilina, cefaclor, cefaxina, ligam-se aos PBP's e impossibilitam a síntese do peptidoglicano, participando na ativação das autolisinas endógenas e consequente lise celular (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998; Al-Haroni, 2008).

Os antibióticos da família dos macrólidos e da família das lincosamidas possuem mecanismos de ação semelhantes. Os macrólidos possuem ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, enquanto as lincosamidas são ativas contra bactérias Gram-positivas anaeróbicas facultativas e, sobretudo, contra bactérias anaeróbicas estritas. Em ambos os casos são antibióticos bacteriostáticos inibidores da síntese de ARN e da síntese proteica, o que acontece como resultado da sua ação na subunidade 50S dos ribossomas bacterianos. De uma forma global, os

macrólidos atravessam a membrana celular de forma passiva, ligando-se seletivamente e reversivelmente, ao componente peptidiltransferase da subunidade 50S dos ribossomas, o que inibe a formação de ligação peptídica e/ou a translocação do ribossoma. Por norma, estes antibióticos não afetam a síntese proteica em células eucarióticas, pois não conseguem permear as membranas mitocondriais (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998; Al-Haroni, 2008).

O metronidazol inibe a síntese de ARN em bactérias anaeróbias estritas e algumas anaeróbias facultativas. Esta molécula não tem atividade na sua forma intacta sendo ativada no meio intracelular de microrganismos com sistemas de transporte de eletrões com potencial negativo, e.g. sistema piruvato-ferredoxina-oxiredutase, que vão transferir eletrões ao sistema permitindo a redução do grupo 5-nitro e ativar a molécula (Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Por fim, as tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese proteica em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estas moléculas interferem com a subunidade 30S ribossomal, não permitindo a ligação dos aminoacil-tARN's aos ribossomas, o que impede a ligação codão-anticodão (Al-Haroni, 2008; Sousa, 2001; Sousa, 2006; Ferreira e Sousa, 1998).

Há tendência para a prescrição excessiva sem fazer uma escolha racional do fármaco mais apropriado (Skucaite *et al.*, 2010). Todavia o papel dos antibióticos em endodontia é limitado. Estes, normalmente, são prescritos de forma profilática, nos casos em que os pacientes estão com intumescimento progressivo e difuso dos tecidos, apresentando sinais de infeção (e.g. febre, mal-estar ou linfadenopatia).

Ao longo do tempo, o uso de antibióticos levou ao aparecimento de bactérias infecciosas resistentes a um ou mais antimicrobianos (Al-Haroni, 2008). O crescente aumento de resistência aos antibióticos vulgarmente receitados é uma preocupação. Alguns trabalhos confirmam que algumas espécies de bactérias (em especial as Gram-negativas anaeróbias), comuns em infeções endodônticas, têm desenvolvido resistência à penicilina (Baumgartner e Xia, 2003). Os antibióticos prescritos com mais frequência em infeções dentárias são a amoxicilina, a penicilina e metronidazol. Estes fármacos possuem potencial para selecionar bactérias resistentes na microflora oral (Sweeney *et*



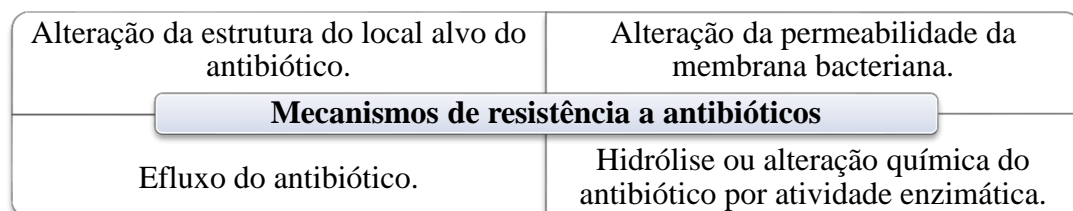
*al.*, 2004). Em certos casos, apenas um ou mesmo nenhum antibiótico consegue travar a infecção bacteriana. A crescente resistência a antibióticos na microflora oral representa um problema no tratamento de infecções endodônticas (Al-Haroni, 2008; Handal e Olsen, 2000).

## VI. Resistência a antibióticos: Transferência génica e recombinação

As bactérias têm demonstrado uma capacidade notável de suportar e se adaptar ao seu ambiente, desenvolvendo inclusive, diferentes mecanismos de resistência a diversos agentes antimicrobianos (Alanis, 2005; Pitout *et al.*, 1997). O termo resistência define a capacidade temporária ou permanente de um organismo e a sua capacidade patogénica de continuar viável e/ou se multiplicar em condições em que outras bactérias da mesma espécie não resistem (Cloete, 2003). O aparecimento e a disseminação da resistência a antibióticos entre os agentes patogénicos humanos é certamente a evolução bacteriana mais marcante das últimas décadas (Rowe-Magnus e Mazel, 1999).

A constante mudança de ambiente das bactérias levou a que estas aumentassem a velocidade de adaptação para sobreviverem. Com novas técnicas que permitem fazer a sequenciação do ADN tornou-se possível fazer o rastreio do aparecimento, desaparecimento ou reaparecimento de genes bacterianos (Porwollik e McClelland, 2003). As alterações genéticas que ocorrem nas bactérias são responsáveis pelo aparecimento de estruturas de virulência, e.g. lipopolissacarídeos, flagelos e fímbrias (estruturas de superfície) assim como a expressão de genes de virulência específicos que modificam a fisiologia celular e a resistência às moléculas de antibiótico pois atribui às bactérias mecanismos de proteção (Fierer e Guiney, 2001).

Pode-se considerar quatro mecanismos de resistência como os fundamentais na defesa das bactérias contra a ação dos antibióticos, como esquematizado na figura 6:



**Figura 4:** Principais mecanismos de resistência a antibióticos (adaptado de Silva, 1996; Al-Haroni, 2008; Cloete, 2003).

Pode-se considerar quatro mecanismos de resistência como os fundamentais na luta das bactérias contra a ação dos antibióticos: (1) alteração da estrutura do local alvo do antibiótico, (2) alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, (3) efluxo do antibiótico e, (4) hidrólise ou alteração química do antibiótico por atividade enzimática (Silva, 1996; Cloete, 2003; Al-Haroni, 2008).

A alteração da estrutura do local alvo do antibiótico na bactéria (1) ocorre quando o alvo intracelular ou o recetor da molécula de antibiótico é modificado pela bactéria, impedindo a ligação antibiótico-alvo bacteriano resultando na inexistência de atividade antimicrobiana do fármaco (Alanis, 2005). Alguns exemplos deste tipo de mecanismo incluem: a modificação na conformação estrutural das proteínas que são ligandos da penicilina (PBPs) observadas em alguns tipos de resistência a penicilina; as alterações em ribossomas que podem tornar as moléculas de antibiótico (aminoglicosídeos, macrólidos e tetraciclina) inativas; e modificações na ADN-girase/topoisomerase o que leva a resistência à família das fluoroquinolonas (Alanis, 2005; Al-Haroni, 2008; Silva, 1996). Este mecanismo está bem disseminado entre as bactérias orais, e.g., *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis* (Al-Haroni, 2008).

Relativamente à alteração da permeabilidade da membrana (2), a troca macromolecular entre a célula e o ambiente é possível devido à presença de proteínas de membrana que funcionam como transportadores de diferentes moléculas. Estas proteínas, conhecidas por porinas, encontram-se na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Muitos antibióticos são impedidos de entrar na célula, sobretudo os que utilizam os canais de porina. Para este impedimento ocorre substituição de uma porina com um canal largo por outra de canal mais estreito, impedindo a entrada de moléculas grandes. Assim a redução da expressão das porinas resulta na impermeabilidade ou redução da captação do fármaco, o que frequentemente leva a resistência a esse antibiótico (Silva, 1996; Al-Haroni, 2008).

O efluxo ativo dos antibióticos (3) é relevante para moléculas cuja ação ocorre dentro da bactéria e tem lugar quando um microrganismo é capaz de desenvolver um mecanismo de transporte ativo que bombeia as moléculas de antibiótico que se encontram dentro do ambiente celular, para fora, até atingir uma concentração abaixo do

necessário para ocorrer atividade antibacteriana. Tal significa que o mecanismo de efluxo deve ser dominante em relação ao mecanismo de influxo do antibiótico para ser realmente efetivo (Alanis, 2005). Inicialmente, este mecanismo estava apenas descrito para moléculas de tetraciclinas e macrólidos, agora é um mecanismo de resistência para diversos antibióticos tais como as fluoroquinolonas ou eritromicina (Alanis, 2005; Al-Haroni, 2008; Silva, 1996).

Outro mecanismo de resistência é a hidrólise ou alteração química do antibiótico por degradação enzimática (4). Tal ocorre quando a bactéria produz uma ou mais enzimas que degradam ou modificam o fármaco tornando-o inativo para a bactéria. O exemplo mais comum deste mecanismo é a resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos devido à ação das  $\beta$ -lactamases. Estas enzimas determinam resistência à maioria dos agentes antimicrobianos usados em medicina dentária (Al-Haroni, 2008; Alanis, 2005). Na tabela 5 estão indicados os principais mecanismos de resistência das bactérias contra os antibióticos mais usados em medicina dentária.

Dependendo da molécula, os antibióticos têm a sua ação em diferentes locais da célula bacteriana como a membrana celular, funções respiratórias, enzimas ou o material genético. Em certos casos, a bactéria apresenta uma reação natural ou adquirida que pode impedir o agente antibacteriano de exercer a sua função (Cloete, 2003; Silva, 1996).

**Tabela 5:** Principais mecanismos de resistência a cada antibiótico (adaptado de Al-Haroni, 2008).

Fármaco antimicrobiano	Principal mecanismo de resistência
<b>Penicilina</b> V (fenoxyetilpenicilina], Amoxicilina e Ampicilina	Resistência enzimática ( $\beta$ -lactamases) e alteração do local alvo.
<b>Metronidazol</b>	Resistência enzimática (5-nitroimidazol redutase).

<b>Fármaco antimicrobiano</b>	<b>Principal mecanismo de resistência</b>
<b>Eritromicina e Clindamicina</b>	Modificação do local alvo, inativação enzimática, bombas de efluxo.
<b>Tetraciclina</b>	Bombas de efluxo, inativação enzimática, proteínas de proteção ribossomal.

Estes fenómenos ocorrem, sobretudo, pela pressão seletiva exercida pelo ambiente que promove o polimorfismo genético dos microrganismos. Isto leva a alterações nas estruturas presentes na membrana bacteriana que são o alvo do sistema imune do hospedeiro (Fierer e Guiney, 2001). Um dos grandes obstáculos em tratamentos com antibióticos é o constante aparecimento de estirpes resistentes. Esta resistência pode ser definida como fenotípica (a bactéria consegue resistir aos antibióticos até uma determinada concentração) ou genotípica (a passagem de genes de resistência entre bactérias). A resistência a antibióticos, resultante da presença de agentes antibacterianos, pode ser classificada como natural ou adquirida (Al-Haroni, 2008). O conhecimento dos processos evolutivos e epidemiológicos na população bacteriana da flora oral é importante para orientar o esquema terapêutico adequado ao controlo do problema.

### **VI.1. Resistência natural ou intrínseca**

A resistência intrínseca é uma característica natural que um microrganismo possui ao se manter viável na presença de um antibiótico (Soares *et al.*, 2012). Este tipo de resistência inclui todos os exemplares de uma espécie bacteriana que não são sensíveis a um determinado antibiótico.

Tal pode ocorrer pela inexistência de uma estrutura específica na bactéria que serve como alvo para o fármaco (como por exemplo o *Mycoplasma* que não tem parede celular, sendo resistente a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos), ou a falta de processos

metabólicos essenciais para a ativação do antibiótico. São conhecidos alguns casos de resistência por inexistência de processos metabólicos em bactérias orais. Por exemplo, em espécies como *Actinomyces* e *Streptococcus*, a ausência da enzima nitroreductase, necessária para converter o metronidazol no seu metabolito ativo faz com que estas bactérias não sejam afetadas pelo fármaco nas suas concentrações terapêuticas (Al-Haroni, 2008).

Outro caso é a incapacidade de um antibiótico interagir, seja de que forma for, com a bactéria. Um exemplo é a vancomicina que, pelo seu elevado peso molecular, não consegue atravessar a membrana externa das bactérias Gram-negativas (Sousa, 2006).

Além da resistência natural a antibióticos característica de algumas bactérias, também existe a resistência adquirida que pode resultar de fenómenos de mutação na sequência de ADN cromossomal ou por aquisição de elementos genéticos (Al-Haroni, 2008; Silva, 1996; Handal e Olsen, 2000).

## **VI.2. Resistência adquirida**

A aquisição de genes de resistência é uma das formas mais fáceis de ultrapassar os efeitos dos antibióticos (Rowe-Magnus e Mazel, 1999).

Os principais processos geradores de variação evolutiva nas bactérias são a recombinação génica (permuta de genes entre duas moléculas de ADN que leva a novas combinações no cromossoma) ou, com menor frequência, mutação cromossómica do genoma bacteriano pré-existente que ocorre por diferentes mecanismos genéticos (Didelot e Maiden, 2010; Al-Haroni, 2008; Eisen, 2000; Tenover, 2006). Estes mecanismos de introdução de genes são apontados como os principais responsáveis pela adaptação das espécies bacterianas ao ambiente em que se encontram, além de serem considerados processos de preservação da integridade genética por meio de reparação de possíveis falhas no ADN bacteriano (Tenover, 2006; Conley, 1992).

Existem duas formas de transferência de material genético por recombinação génica: transferência génica vertical e transferência génica horizontal (Ferreira e Sousa, 1998). Na transferência vertical ocorre a passagem de genes próprios ou adquiridos dos ascendentes para os seus descendentes. Por outro lado, na transferência génica horizontal a passagem de informação genética é intra ou interespécies da mesma geração podendo ocorrer por diferentes mecanismos (Al-Haroni, 2008; Eisen, 2000; Sousa, 2006; Tenover, 2006). Esta transferência horizontal de genes pode provocar efeitos deletérios à bactéria recetora, o que leva a que esta seja eliminada pela presença de mutações deletérias que não são propícias à sobrevivência do microrganismo (Thomas e Nielsen, 2005).

Nestes processos de transferência genética, a presença de biofilmes (característicos em grande parte das infeções endodônticas) consegue fornecer às bactérias o meio necessário para a rápida aquisição e disseminação de genes de resistência (Sedgley *et al.*, 2008).

A mutação é um processo que pode ocorrer de forma natural no ADN cromossómico ou plasmídico com uma frequência de 1 em 10 milhões de pares de bases de ADN. Se esta mutação levar à aquisição de um gene de resistência a um determinado agente antimicrobiano, o uso terapêutico deste agente seleciona o gene responsável pela resistência. A acumulação de mutações em genes distintos pode afetar a eficácia de várias famílias de antibióticos, levando ao aparecimento de clones bacterianos multirresistentes. É o caso de estirpes Gram-negativas produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro, que resultam de mutações nos genes TEM-1 e SHV-1 (Sousa, 2006).

Os mecanismos de troca genética, característicos da transferência horizontal, conferem às bactérias uma vantagem seletiva em relação ao hospedeiro, pois estas conseguem adaptar-se à presença de agentes antimicrobianos no ambiente em que estão inseridas e transferir esta capacidade de forma rápida (Tenover, 2006; Thomas e Nielsen, 2005). Pela importância que estes mecanismos representam na aquisição de resistências por parte das bactérias é que, nesta tese, se dá mais ênfase à transferência horizontal de genes.

### VI.2.i. Transferência horizontal de genes

A transferência horizontal de genes é uma das grandes responsáveis pelo aumento de resistência a antibióticos, mesmo em comparação com os processos de mutação, sendo o caminho mais frequente na disseminação de genes de resistência (Al-Haroni, 2008; Eisen, 2000).

A transferência horizontal de genes pode ocorrer, sobretudo por três mecanismos: transdução, transformação e conjugação (Conley, 1992; Porwollik e McClelland, 2003; Thomas e Nielsen, 2005; Tenover, 2006; Al-Haroni, 2008; Jain *et al.*, 2002). Neste processo também são importantes os elementos móveis, cuja presença está associada a alguns genes codificadores de funções vantajosas para a sobrevivência de microrganismos, e.g., os plasmídeos, os transposões e os integrões (Sousa, 2006; van Elsas e Bailey, 2002; Al-Haroni, 2008).

O mecanismo de transdução é um processo de transferência génica que ocorre entre bactérias por meio de bacteriófagos, que são vírus capazes de infectar as células bacterianas (Tenover, 2006; Eisen, 2000). Neste processo os fagos podem infectar as bactérias de duas formas: através do ciclo lítico ou pelo ciclo lisogénico. No ciclo lítico, os vírus injetam o genoma viral na célula bacteriana, impedindo-a de realizar a autorreplicação ao mesmo tempo que inicia a produção das proteínas que originarão novos fagos. No final deste processo, os bacteriófagos recém-formados produzem lisozimas capazes de romper a parede celular bacteriana, de forma a libertar os novos fagos para o ambiente. Estes estarão disponíveis para infectar novas bactérias suscetíveis (Kelly *et al.*, 2009).

Por sua vez, no ciclo lisogénico o ADN do fago é incorporado no ADN bacteriano, ou profago, induzindo recombinação génica da célula bacteriana recetora sem ocorrência de lise. A via de transdução varia conforme a biologia do fago e do ambiente celular, o que acontece no momento em que o material genético do fago é introduzido (Brabban *et al.*, 2005).

Para ocorrência destes processos, os bacteriófagos reconhecem componentes presentes na superfície da célula recetora (e.g. proteínas e lipopolissacarídeos), o que lhes confere uma especificidade elevada (Brabban *et al.*, 2005). Os bacteriófagos são um importante meio pelo qual os microrganismos se adaptam a novos ambientes de forma mais permanente, o que oferece vantagem seletiva às bactérias patogénicas pelo impacto que representa na transdução de genes de resistência a antibióticos (de la Cruz e Davies, 2000).

No processo de transformação, organismos procariotas adquirem e incorporam um segmento de ADN extracelular (e.g. cromossomas, plasmídeos e ADN de fagos), que foi libertado por outra bactéria após lise. Por este meio, uma bactéria patogénica consegue deslocar genes de resistência para linhagens suscetíveis, desde que as bactérias se encontrem num estado fisiológico propício (estado de competência). Através deste mecanismo, quando o ADN livre codifica resistência a antibióticos, existe a possibilidade de transmitir esta mesma resistência à bactéria recetora, desde que a integração dessa informação seja eficiente (Al-Haroni, 2008; Tenover, 2006; Jain *et al.*, 2002). Os principais requisitos para o mecanismo de transformação são: a libertação e persistência do ADN dador no ambiente, a presença de uma célula recetora competente e a capacidade de integração no ADN recetor (Kelly *et al.*, 2009).

Por fim, o mecanismo de conjugação é considerado o processo inicial de disseminação de genes entre populações bacterianas (Rowe-Magnus e Mazel, 1999). Aqui, a transferência génica ocorre por contacto interbacteriano (dador e recetor) através de uma estrutura proteica semelhante a uma haste, cujo papel é auxiliar a união entre as células bacterianas, denominado por *pili* conjugativo ou *pili* sexual. Este processo é orientado por elementos genéticos móveis (plasmídeos) transportadores dos genes responsáveis pela codificação de funções para a sua própria transferência às bactérias recetoras, para além da atividade de resistência a antibióticos. O gene codificador do *pili* conjugativo está presente no plasmídeo F ou Fator F, em que as células F<sup>+</sup> são dadoras de material genético e as células F<sup>-</sup> são as recetoras, por não possuírem o Fator F (Kelly *et al.*, 2009; Creager, 2007). Este processo ocorre após o contacto inicial, que leva à fusão das membranas celulares bacterianas promovendo a sua estabilidade. Aqui, uma cópia de cadeia simples do ADN plasmídico é transferida

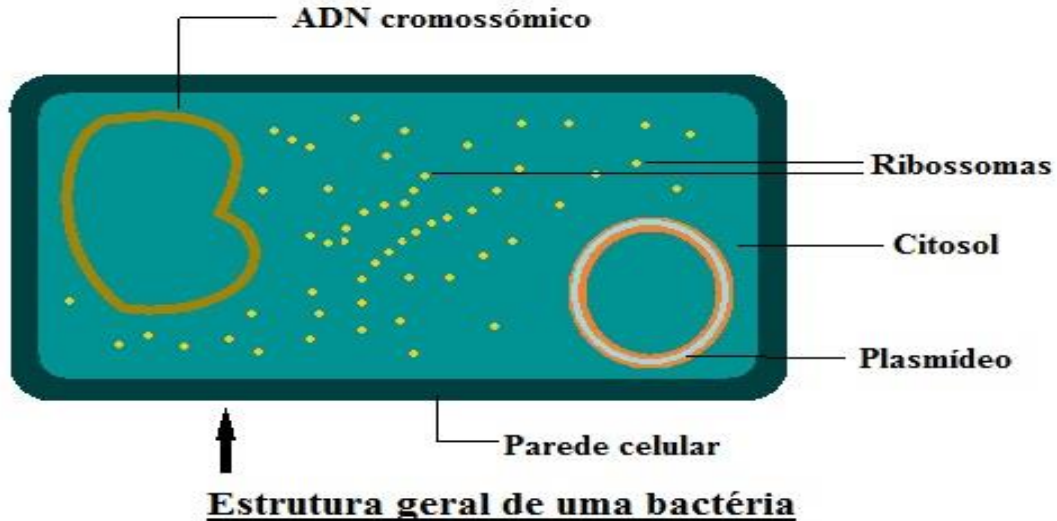
para a célula recetora (processo de transferência). Nesta bactéria ocorre a síntese de uma cópia complementar da cadeia de ADN recém-recebida, tornando-se esta uma célula F<sup>+</sup>. Nas bactérias Gram-negativas este processo ocorre conforme o descrito, enquanto nas bactérias Gram-positivas, a conjugação é iniciada pela produção de feromonas, o que facilita a fixação do organismo dador no recetor, permitindo a troca de ADN (Tenover, 2006).

Como já foi mencionado, sequências móveis como os integrões, transposões e plasmídeos possuem um papel importante na transferência horizontal de genes (van Elsas e Bailey, 2002; Al-Haroni, 2008).

Uma das definições de integrões foi formulada por Hall e Collis (1995) que os definem como possuidores dos componentes do sistema de recombinação *site-specific*. Estes são capazes de reconhecer e capturar cassetes génicas móveis (Fluit e Schmitz, 1999; Hall e Collis, 1995). De fato, os integrões são detentores de sistemas de recombinação *site-specific* mediados pela reorganização dos ORF's (*Open Reading Frames*) presentes em cassetes génicas. Estes permitem a captura de muitos genes de resistência diferentes (Sousa, 2006; Cambray *et al.*, 2010; Rowe-Magnus e Mazel, 2001; Fluit e Schmitz, 1999; Hall e Collis, 1995). Os integrões possuem um gene *intI*, que codifica uma integrase, e um local de recombinação denominado por *attI*, onde são inseridas as cassetes génicas (Sousa, 2006; Partridge *et al.*, 2009); (Rowe-Magnus e Mazel, 1999). O mesmo integrão consegue capturar um conjunto de várias cassetes génicas nas quais a sua inserção ou excisão é determinada através da recombinação efetuada pela integrase entre *attI* e o local específico (Sousa, 2006; Partridge *et al.*, 2009; Fluit e Schmitz, 1999). Existem várias classes de integrões, mas são os pertencentes às classes 1, 2 e 3 os responsáveis pela resistência a antibióticos. Ao estarem presentes em plasmídeos e transposões, os integrões de classe 1 contribuem para a disseminação da resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (Sousa, 2006; Fluit e Schmitz, 1999; Hall e Collis, 1995).

Os plasmídeos são moléculas de ADN circulares presentes no citosol bacteriano (como representado na figura 4), com capacidade de replicação autónoma (Sousa, 2006). Os plasmídeos variam em tamanho, possuindo genes que em condições normais

não são vitais à sobrevivência celular, mas que conferem vantagens à bactéria, como tolerância a metais pesados e resistência a antibióticos (Sousa, 2006).



**Figura 5:** Esquema representativo de uma bactéria contendo plasmídeos (adaptado de Killham e Prosser, 2007).

Os genes que codificam resistência a agentes antimicrobianos podem estar presentes no ADN cromossomal ou em plasmídeos (representado na figura 4). Enquanto o ADN cromossomal é relativamente estável, o ADN plasmídico é facilmente transportado de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana, o que permite a deslocação de genes como os responsáveis pela resistência a antibióticos (Neves *et al.*, 2007; Creager, 2007). Para além da transferência de plasmídeos que pode ocorrer por conjugação, estas moléculas podem também ser transferidas no decurso de autorreplicação, transformação e transdução (Brigulla e Wackernagel, 2010). Os plasmídeos mais importantes são os que possuem o fator R (fator de resistência), que carrega o determinante r (conjunto de genes responsáveis pela resistência) cuja função é inativar a ação do antibiótico. Outro grupo de genes está encarregado de controlar os processos de transferência de genes (Sousa, 2006; Creager, 2007). A maior parte da resistência bacteriana é atribuída aos elementos genéticos transferíveis, sobretudo o Fator F (Creager, 2007).

Os transposões são segmentos móveis de ADN bacteriano que, pela presença do gene codificador da transposase que lhe atribui a capacidade de alterar a sua localização, conseguem estar presentes tanto nos cromossomas como nos plasmídeos bacterianos (Kelly *et al.*, 2009). A enzima transposase tem a função de cortar as extremidades de ADN de um elemento transponível de modo a que este se possa ligar à molécula de ADN alvo. Como tal, os transposões possuem a informação necessária para a sua própria transposição (Thomas e Nielsen, 2005). As sequências de inserção (IS) são transposões simples que contêm apenas um gene que codifica a transposase, delimitado pelos locais de reconhecimento. Estes locais são compostos por sequências curtas de ADN invertidas e repetidas (IR) que são reconhecidas pela enzima como local de recombinação entre essa sequência e o cromossoma onde vai ser inserida (Sousa, 2006; Passarge, 2004). A figura 5 representa uma sequência de inserção.



**Figura 6:** Representação da estrutura de uma IS (adaptado de Sousa, 2006).

Entre as suas características, as IS possuem a capacidade de modificar a expressão genética, sequestrar genes e promover rearranjos no genoma. O poder de translocação das IS torna o microrganismo capaz de se adaptar às alterações do ambiente, podendo conferir resistência aos antibióticos (Ohtsubo e Sekine, 1996; Murai *et al.*, 1995; Passarge, 2004).

## VI.2.ii. Genes de resistência em bactérias da cavidade oral

Os genes de resistência codificam os agentes responsáveis pelos mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos.

As bactérias orais são especialmente resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por produzirem as enzimas  $\beta$ -lactamases (Rôças e Siqueira Jr, 2012). A resistência associada às  $\beta$ -lactamases foi frequentemente relacionada com bactérias anaeróbias Gram-negativas, e.g. *Prevotella* spp. (Jungermann *et al.*, 2011). Também é comum encontrar nestas bactérias genes que codificam as enzimas metilase, a indução da produção de proteínas de proteção de ribossomas ou para a formação de bombas de efluxo (Rôças e Siqueira Jr, 2012).

Apesar da presença do gene de resistência em espécies bacterianas não implicar a sua expressão, a sua inexistência implica a falta de resistência por um mecanismo genético em particular (Siqueira Jr e Rôças, 2005b). Tal demonstra a importância de se saber quais os genes de resistência presentes em determinadas espécies de bactérias para se saber qual a opção terapêutica mais viável e correta.

Alguns dos estudos desenvolvidos tiveram como foco encontrar os genes responsáveis pela resistência dos agentes etiológicos destas mesmas infeções. Estes genes carregam a informação necessária para conferir resistência a determinados antibióticos. A resistência a antibióticos pode ser atribuída por um ou mais genes. A tabela 6 faz a correspondência dos genes de resistência a cada antibiótico usado em endodontia:

**Tabela 6:** Genes que conferem resistência bacteriana e o antibiótico correspondente.

Genes de resistência	Antibióticos
<b>bla<sub>TEM</sub></b>	Resistência a antibióticos $\beta$ -lactâmicos
<b>cfxA</b>	

Genes de resistência	Antibióticos
<b>ermC</b>	Resistência à eritromicina
<b>tetM</b>	Resistência às tetraciclinas
<b>Teto</b>	
<b>tetS</b>	
<b>tetW</b>	

Estes genes conferem às bactérias portadoras um conjunto de características que as torna resistentes aos antibióticos. O gene *bla<sub>TEM</sub>* e *cfxA* são responsáveis pela produção de  $\beta$ -lactamases, considerado o mecanismo de resistência mais importante contra os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Cantón *et al.*, 2008; Lartigue *et al.*, 2002; Al-Haroni, 2008; Bush *et al.*, 1995; Jungermann *et al.*, 2011). Estas enzimas fazem parte do grupo de proteínas que degradam ou modificam os fármacos  $\beta$ -lactâmicos antes destes conseguirem entrar em contacto com o local alvo. As  $\beta$ -lactamases ligam-se ao carbonilo do anel  $\beta$ -lactâmico e hidrolisam a sua ligação amida (Cantón *et al.*, 2008).

Já foram descritas mais do que 300  $\beta$ -lactamases em diversas bactérias, que diferem pelo seu perfil de substrato, potencial de inibição e características fisiológicas (Al-Haroni, 2008). A classificação molecular destas enzimas baseia-se na sequência de aminoácidos que divide as  $\beta$ -lactamases em classes. As classes A, C e D utilizam a serina para a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, enquanto na classe B estão metaloenzimas que requerem iões de zinco divalentes como substrato de hidrólise. A classe B de  $\beta$ -lactamases são as mais ameaçadoras pois conseguem inativar quase todas as moléculas  $\beta$ -lactâmicas, incluindo os carbapenemos (Bush, 1989a; Bush, 1989b; Bush e Jacoby, 2010; Al-Haroni, 2008). A produção constitutiva ou induzida de  $\beta$ -lactamases por bactérias pode ser abundante (Bush *et al.*, 1995; Al-Haroni, 2008). Estas enzimas são geralmente excretadas em grandes quantidades nas bactérias Gram-positivas. Como tal, em caso de infeções mistas (mais que um agente etiológico), as  $\beta$ -lactamases também conseguem proteger os outros microrganismos presentes no local de infeção. Tal acontecimento tem importância clínica, especialmente em infeções endodônticas, pois outros mecanismos de resistência, e.g. reduzida permeabilidade de membrana, podem

atuar em conjunto com as  $\beta$ -lactamases para proteção das bactérias contra antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Em consequência, a redução da permeabilidade da membrana aos agentes antibacterianos permite que pequenas quantidades de  $\beta$ -lactamases localizadas em pontos estratégicos apresentem uma resistência elevada ao fármaco (Al-Haroni, 2008; Handal e Olsen, 2000).

O gene *ermC* é responsável pela produção de enzimas rARN metilase, sendo um dos responsáveis pela resistência a eritromicina (Rôças e Siqueira Jr, 2012; Ding *et al.*, 2012; Martineau *et al.*, 2000; Brzychczy-Włoch *et al.*, 2010). As alterações na estrutura do ARN ribossomal (rARN) previnem a ligação dos antibióticos macrólidos, o que é um importante mecanismo de proteção que confere uma resistência de nível elevado. Estas enzimas são codificadas por um ou mais genes *erm* de resistência à eritromicina (Ding *et al.*, 2012). De uma forma geral, ocorre a metilação de uma única adenina no rARN 23S da subunidade 50S ribossomal, prevenindo a ligação do antibiótico (Roe *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1996).

A resistência ao antibiótico tetraciclina pode ocorrer, sobretudo, por dois mecanismos, i.e., efluxo do fármaco e proteção ribossomal (Pereira-Maia *et al.*, 2010; Speer *et al.*, 1992). Os genes *tetM*, *tetO*, *tetS* e *tetW* detetados no estudo de (Rôças e Siqueira Jr, 2012) são responsáveis pela resistência às tetraciclinas por proteção ribossomal (Klare *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2012; Speer *et al.*, 1992). Em bactérias sensíveis, a tetraciclina liga-se ao ribossoma e muda a sua conformação padrão interrompendo a síntese proteica. No mecanismo de proteção ribossomal, as proteínas citoplasmáticas que protegem o ribossoma da ação das tetraciclinas fazem com que a síntese proteica prossiga normalmente, sendo este considerado um mecanismo mais eficaz do que o efluxo do antibiótico (Speer *et al.*, 1992; Pereira-Maia *et al.*, 2010). Contudo ainda é necessário desenvolver mais estudos para se escrutinar o mecanismo de ação das proteínas de proteção dos ribossomas (Speer *et al.*, 1992).

Estudos realizados por PCR por (Jungermann *et al.*, 2011) verificaram que nas infecções primárias pré-operatórias, os genes de resistência *bla<sub>TEM-1</sub>*, *cfxA*, *tetM*, *tetW* e *tetQ* têm uma prevalência de cerca de 43%, 17%, 17%, 20% e 10%, respetivamente. Enquanto em situações pré-obturação em infecções primárias apenas foram detetados os

genes *bla<sub>TEM-1</sub>* e *tetM* com uma prevalência de 10% e 30% pela mesma ordem. Este mesmo estudo verificou que nas infecções persistentes em situação pré-operatória, os genes de resistência mais frequentemente detetados eram os *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>Z</sub>*, *tetM*, *tetW* e *tetQ*, cuja prevalência se situa na ordem de 13%, 7%, 20%, 13% e 7% respetivamente. Por outro lado, em infecções desta mesma natureza e em situação de pré-obturação foram encontrados os genes *bla<sub>TEM-1</sub>*, *tetM* e *tetW* todos com prevalência de 7% (Jungermann *et al.*, 2011).

As moléculas  $\beta$ -lactâmicas são os agentes antibacterianos prescritos com mais frequência em todo o mundo. Como tal, não é surpreendente que a resistência a estes fármacos se tenha tornado um grande problema clínico (Pitout *et al.*, 1997; Al-Haroni, 2008).

O ensaio desenvolvido por (Rôças e Siqueira Jr, 2012) pesquisou por PCR em tempo real, a presença de genes de resistência em algumas espécies bacterianas presentes na flora bacteriana, obtendo o resultado apresentado na tabela 6:

**Tabela 7:** Genes de resistência identificados em bactérias da flora oral (adaptado de Rôças e Siqueira Jr, 2012):

Genes <sup>Res</sup> Espécies	<i>blaTEM</i>	<i>cfxA</i>	<i>ermC</i>	<i>tetM</i>	<i>teto</i>	<i>tetS</i>	<i>tetW</i>
<i>Campylobactercurvus</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Dialisterinvisus</i>	+	-	+	+	-	-	-
<i>Fusobacteriumnucleatum</i>	+	-	+	-	-	-	+
<i>Fusobacteriumsp.</i> Clone BS019	+	-	-	-	-	-	-
<i>Fusobacteriumsp.</i> Clone CZ006	+	-	-	+	-	-	-
<i>Parvimonas micra</i>	-	-	-	-	-	-	+

Genes <sup>Res</sup> Espécies	blaTEM	cfxA	ermC	tetM	teto	tetS	tetW
<i>Prevotellasp.</i> Oral clone FM005	+	+	-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium pro- pionicum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoramibacter lac- tolyticus</i>	-	-	+	-	-	+	-

**Legenda:** + Presença; - Ausência

A identificação da resistência a antibióticos por métodos moleculares, providencia um método eficiente de registo de resistência a agentes específicos em espécies clínicas de microrganismos, sobretudo por este tipo de metodologia ser mais eficiente e sensível do que as tecnologias baseadas em métodos clássicos de cultura (Jungermann *et al.*, 2011).

## VII. Uso adequado de antibióticos em endodontia

Como já foi mencionado, o aparecimento e disseminação de resistências a agentes antimicrobianos está a evoluir de forma avassaladora. A prevalência destas resistências retira eficácia ao tratamento antibacteriano. De fato, já em 1945, o próprio Sir Alexander Flemming, numa entrevista de rádio para a BBC de Londres, chamava a atenção a que: “O tratamento seria decepcionante se a penicilina não fosse utilizada em microrganismos vulneráveis a este fármaco e se a dose indicada e a duração do tratamento não fossem respeitadas” (Sekiguchi *et al.*, 2007). Esta declaração reforça a ideia de que o uso inadequado dos antibióticos e a existência de estirpes bacterianas resistentes comprometem a ação destes fármacos.

É do conhecimento geral que grande parte dos antibióticos é prescrita de forma inapropriada. Os erros mais comuns incluem o uso de um agente farmacológico com espectro de ação inadequado, a administração de antibióticos quando não se tem a completa certeza de que o agente etiológico da infeção é de natureza bacteriana, e o uso prolongado e abusivo de antibióticos intravenosos (Weller e Jamieson, 2004).

O papel do profissional de saúde deve ser sempre avaliar a real necessidade da administração de antibióticos. Em cerca de 60% dos casos de infeção, as defesas próprias do hospedeiro são capazes de controlar o processo sem a necessidade de um agente antimicrobiano (Oliveira e Uzeda, 2010). Os médicos dentistas possuem permissão legal para prescrever antibióticos e, apesar de o fazerem com menor frequência, estes profissionais têm tendência para repetir a prescrição dos mesmos fármacos (Al-Haroni, 2008). No entanto, é importante ter consciência que a prescrição de antibióticos não se deve tornar uma prática habitual, devendo-se seguir um conjunto de *guidelines* para se assegurar o seu bom uso (Dumarcet, 2012).

Os antibióticos devem ser restritos a condições clínicas, que não sejam frequentes, em cuidados orais e odontológicos (Dumarcet, 2012). O crescente número de estirpes bacterianas resistentes sustenta que este acontecimento está relacionado com o uso indiscriminado de fármacos desta natureza (Oliveira e Uzeda, 2010).

Existem três estratégias para a prevenção do desenvolvimento de resistências bacterianas a antibióticos. A primeira estratégia é a prevenção do aparecimento de infecções, reduzindo a necessidade de se recorrer à terapêutica. A segunda medida é, em quadros clínicos em que é necessário recorrer a antimicrobianos, o fazer de forma adequada e consciente. Por último, recorrer a um conjunto de medidas preventivas da disseminação de clones de resistência (Al-Haroni, 2008).

Como é de conhecimento geral, a prevenção é fundamental para a saúde e bem-estar da população. O aparecimento de cáries pode ser evitado se a intervenção primária atuar em simultâneo com três fatores fisiopatológicos, i.e. bactérias, açúcares e dentes. Como tal, é importante ter uma dieta pobre em açúcares associada com a higienização regular e adequada da cavidade oral. É importante incentivar a população à escovagem dos dentes, entre as refeições, no mínimo duas vezes ao dia, com o uso de uma escova adequada e dentífrico com uma concentração de 1000ppm  $\pm$  10% como medidas de prevenção do desenvolvimento da cárie dentária (Eusébio, 2009; Cosme e Marques, 2009).

Em caso de infeção, a escolha do agente antimicrobiano deve ser realizada segundo a sua efetividade contra o agente etiológico da infeção. Antes de se iniciar a terapia antimicrobiana o médico dentista deve recolher toda a informação necessária para decidir se é realmente uma infeção, e se esta é de origem bacteriana, viral ou fúngica. Uma simples dor de dentes, por si só, não é suficiente para ser necessária a prescrição de antibiótico. O doente deve apresentar sinais clássicos de infeção, como intumescimento dos tecidos, eritema superficial e, febre ou linfadenopatia devem estar presentes (Handal e Olsen, 2000).

A agência francesa de segurança sanitária de produtos de saúde (AFSSAPS) faz uma série de recomendações para a prescrição de antibióticos como profilaxia e tratamento. Estas recomendações estão enumeradas na tabela 4 (adaptado de (Dumarcet, 2012).

**Tabela 8:** Recomendações gerais estabelecidas para casos de terapêutica com antibióticos (Dumarcet, 2012).

<b>Caso</b>	<b>Recomendações</b>
<b>Antibioterapia profilática</b>	<p>É recomendada de acordo com o risco infeccioso do paciente e do tipo de procedimento invasivo usado;</p> <p>É usada para limitar o risco de endocardite infecciosa ou para limitar o risco de infecção localizada e sua possível disseminação;</p> <p>A sua recomendação deve ser limitada o máximo possível desde a sua última recomendação;</p> <p>É recomendada em pacientes com elevado risco de endocardite infecciosa, em todos os casos de cirurgias em odontologia (envolvendo gengivas ou a região periapical) e em caso de manipulação da mucosa oral;</p>
<b>Antibioterapia</b>	<p>Usado apenas em casos de manifestação de um foco infeccioso;</p> <p>A antibioterapia é sempre indicada como tratamento aquando a presença de uma infecção com febre, convulsões, adenopatia, ou edema persistente ou progressivo.</p>

As recomendações estipuladas pela AFSSAPS servem como guia para que a prescrição de antibióticos seja realizada de forma consciente e apropriada, evitando assim uma prescrição de antibióticos abusiva.

Tudo isto demonstra que a administração de antibióticos continua a ser um assunto de extrema importância para a saúde pública, sobretudo pela ameaça que o seu uso inadequado representa.

## VIII. Conclusão

Os casos de bactérias resistentes a tratamentos por antibióticos são cada vez mais comuns em todo o mundo, o que levanta sérios e graves problemas nos tratamentos destas infeções. Estas resistências têm vindo a colocar em causa a eficácia dos antibióticos usados nos tratamentos em infeções endodônticas, além de reduzirem as alternativas viáveis de tratamento.

Ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos muitos estudos de forma a determinar como é que as resistências surgem e quais são os fatores que levam ao aparecimento destes mecanismos de defesa. Até à data considera-se que a pressão seletiva causada pelo uso abusivo de antibióticos tenha sido um dos fatores principais para o aparecimento desta problemática. Assim, quando sujeitas a determinadas condições, as bactérias conseguem desenvolver, por fenómenos de recombinação génica e/ou mutação, novos mecanismos de defesa a alguns agentes antibacterianos, que são transmitidos para as linhagens posteriores, criando novas estirpes de bactérias resistentes. Estes mecanismos de defesa são codificados por genes que podem ser identificados por meio de métodos moleculares. Estes métodos laboratoriais permitem fazer a associação das resistências com certos genes (e.g. *bla<sub>TEM</sub>*, *cfxA*, *ermC*, *tetM*, *tetO*, *tetS* e *tetW*), o que pode ser muito vantajoso para a escolha do antibiótico mais eficaz para o tratamento de infeções endodônticas.

A grande capacidade de disseminação bacteriana é preocupante para a saúde pública. Os crescentes casos de infeções por estirpes resistentes começam a assumir uma posição preocupante pois as alternativas de tratamento são cada vez mais escassas. Por este motivo, é fundamental que o uso de medicamentos não seja realizado de forma leviana, obedecendo a um conjunto de diretrizes que ajudam na triagem dos casos em que é fundamental o uso de antibióticos. Também é muito importante que o profissional de saúde eduque a população de forma a usar os antibióticos de forma correta para minimizar os efeitos colaterais do seu uso abusivo.

## Referências Bibliográficas

A.D.A.M. (2012) Tooth anatomy.  
<http://www.iuhealth.net/ADAM/doc/HealthIllustratedEncyclopedia/2/8974.htm>.

Al-Haroni, M. (2008) Bacterial resistance and the dental professionals' role to halt the problem. *Journal of Dentistry*, 36, 95-103.

Alanis, A. J. (2005) Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, 36, 697-705.

Almståhl, A., Carlén, A., Eliasson, L. e Lingström, P. (2010) Lactobacillus species in supragingival plaque in subjects with hyposalivation. *Archives of Oral Biology*, 55, 255-259.

Alves, F. R. F. (2004) Compreendendo a etiologia microbiana das infecções endodônticas. *Rev. Biociên.*, 10, 67-71.

Baumgartner, J. C. e Xia, T. (2003) Antibiotic Susceptibility of Bacteria Associated with Endodontic Abscesses. *Journal of Endodontics*, 29, 44-47.

Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D. G. e Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15, 222-228.

Beveridge, T. J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 181, 4725-4733.

Bonan, R. F., Batista, A. U. D. e Hussne, R. P. (2011) Comparação do Uso do Hipoclorito de Sódio e da Clorexidina como Solução Irrigadora no Tratamento Endodôntico: Revisão de Literatura. *R Bras Ci Saúde*, 15, 237-244.

Brabban, A. D., Hite, E. e Callaway, T. R. (2005) Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis*, 2, 287-303.

Brigulla, M. e Wackernagel, W. (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 1027-41.

Brzywczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Bodaszewska, M., Pabian, W., Bulanda, M., Kochan, P., Strus, M. e Heczko, P. B. (2010) Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 780-786.

Bush, K. (1989a) Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 264-70.

Bush, K. (1989b) Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 271-6.

Bush, K. e Jacoby, G. A. (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 969-76.

Bush, K., Jacoby, G. A. e Medeiros, A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 1211-33.

Cambray, G., Guerout, A. M. e Mazel, D. (2010) Integrons. *Annu Rev Genet*, 44, 141-66.

Cantón, R., Morosini, M. I., Martin, O., De La Maza, S. e De La Pedrosa, E. G. G. (2008) IRT and CMT b-lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect*, 14, 53-62.

Chen, L., Xiong, Z., Sun, L., Yang, J. e Jin, Q. (2012) VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 40, D641-5.

Chu, F. C. S., Tsang, C. S. P., Chow, T. W. e Samaranayake, L. P. (2005) Identification of Cultivable Microorganisms from Primary Endodontic Infections with Exposed and Unexposed Pulp Space. *Journal of Endodontics*, 31, 424-429.

Cloete, T. E. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 277-282.

Conley, E. C. (1992) Mechanism and genetic control of recombination in bacteria. *Mutat Res*, 284, 75-96.

Conrads, G., Gharbia, S. E., Gulabivala, K., Lampert, F. e Shah, H. N. (1997) The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod*, 23, 433-8.

Cosme, P. e Marques, P. F. (2009) Cáries precoces de infância - Uma revisão bibliográfica. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 46, 109-116.

Creager, A. N. H. (2007) Adaptation or selection? Old issues and new stakes in the postwar debates over bacterial drug resistance. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 38, 159-190.

Cuy, J. L., Mann, A. B., Livi, K. J., Teaford, M. F. e Weihs, T. P. (2002) Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*, 47, 281-291.

De La Cruz, F. e Davies, J. (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*, 8, 128-33.

Dentist, F. Y. (2012) Root Canal Treatments. <http://findyourdentist.co.uk/treatments/root-canal-treatments>.

Devine, D. A. e Marsh, P. D. (2009) *Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications*.

Didelot, X. e Maiden, M. C. J. (2010) Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology*, 18, 315-322.

Ding, Z. F., Zhang, H., Tang, W., Tong, C. Y., Li, R. T., Chen, L. X., Pu, L. J., Zhu, Z. B. e Cui, Y. D. (2012) Methylase Genes-Mediated Erythromycin Resistance in

*Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis in China. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67, 170-179.

Dumarcet, N. (2012) Prescription of antibiotics for oral and dental care. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 42, 193-212.

Eisen, J. A. (2000) Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 606-611.

Eusébio, D. (2009) De pequenito se trata o dentito - o papel do Médico de Família. *Rev Port Clin Geral*, 25, 429-437.

Feng, Z. e Weinberg, A. (2006) Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40, 50-76.

Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. (1998) *Microbiologia*, Lousã, Lidel.

Fierer, J. e Guiney, D. G. (2001) Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest*, 107, 775-780.10.1172/JCI12561.

Figdor, D. e Gulabivala, K. (2011) Survival against the odds: microbiology of root canals associated with post-treatment disease. *Endodontic topics*, 18, 62-77.

Fluit, A. C. e Schmitz, F. J. (1999) Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, 761-70.

Frank, S. A. e Barbour, A. G. (2006) Within-host dynamics of antigenic variation. *Infection, Genetics and Evolution*, 6, 141-146.

Gatti, J. J., Dobeck, J. M., Smith, C., White, R. R., Socransky, S. S. e Skobe, Z. (2000) Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol*, 16, 197-204.

Guimarães, D. O., Momesso, L. S. e Pupo, M. T. (2010) Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimentos de novos agentes. *Quim. Nova*, 33, 667-679.

Hall, R. M. e Collis, C. M. (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*, 15, 593-600.

Handal, T. e Olsen, I. (2000) Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *Eur J Oral Sci*, 108, 163-74.

Hogg, S. D., Whiley, R. A. e De Soet, J. J. (1997) Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 62-6.

Infarmed Prontuário Terapêutico *on-line*.

Jacinto, R. C., Montagner, F., Signoretti, F. G. C., Almeida, G. C. e Gomes, B. P. F. A. (2008) Frequency, Microbial Interactions, and Antimicrobial Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* Isolated from Primary Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*, 34, 1451-1456.

Jain, R., Rivera, M. C., Moore, J. E. e Lake, J. A. (2002) Horizontal Gene Transfer in Microbial Genome Evolution. *Theoretical Population Biology*, 61, 489-495.

Jansen, A. e Yu, J. (2006) Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 138-142.

Jungermann, G. B., Burns, K., Nandakumar, R., Tolba, M., Venezia, R. A. e Fouad, A. F. (2011) Antibiotic Resistance in Primary and Persistent Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*, 37, 1337-1344.

Kelly, B. G., Vespermann, A. e Bolton, D. J. (2009) The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol*, 47, 951-68.

Khabbaz, M. G., Anastasiadis, P. L. e Sykaras, S. N. (2001) Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: Association with pulpal pain. *Oral*

*Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 91, 587-593.

Killham, K. E. N. e Prosser, J. I. (2007) 5 - THE PROKARYOTES. IN ELDOR, A. P. (Ed.) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition)*. San Diego, Academic Press.

Kinder, S. A. e Holt, S. C. (1989) Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect Immun*, 57, 3425-3433.

Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G. e Witte, W. (2003) Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 269-290.

Komabayashi, T. e Zhu, Q. (2010) Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 109, e75-e81.

Kuehn, M. J. e Kesty, N. C. (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*, 19, 2645-55.

Kurita-Ochiai, T., Hashizume, T., Yonezawa, H., Ochiai, K. e Yamamoto, M. (2006) Characterization of the effects of butyric acid on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47, 67-74.

La-Scalea, M. A., Serrano, S. H. P. e Gutz, I. G. R. (1999) Voltammetric Behaviour of Metronidazole at Mercury Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.*, 10, 127-135.

Laboratory, U. D. Fighting the Fight for Healthy Teeth. <http://udelldentallab.files.wordpress.com/2011/06/tooth-inside.jpg>.

Lartigue, M. F., Leflon-Guibout, V., Poirel, L., Nordmann, P. e Nicolas-Chanoine, M. H. (2002) Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 Upstream from bla<sub>TEM</sub> Genes and Their Relationship to B-Lactam Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 4035-4037.

Lins, C. C. S. A., Lima, G. A. e Travassos, R. M. C. (2009) Participação dos fungos nas infecções endodônticas. *Int J Dent*, 9, 215-219.

Magazine, D. H. (2008) Killing Tooth Infection. <http://worldental.org/teeth/killing-tooth-infection/331/>.

Martineau, F., Picard, F. J., Lansac, N., Ménard, C., Roy, P. H., Ouellette, M. e Bergeron, M. G. (2000) Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 231-238.

Masset, A., Staszky, C. e Gasse, H. (2006) The blood vessel system in the periodontal ligament of the equine cheek teeth – Part II: The micro-architecture and its functional implications in a constantly remodelling system. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 188, 535-539.

Munir, M., Wong, K. e Xagorarakis, I. (2011) Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, 45, 681-693.

Murai, N., Kamata, H., Nagashima, Y., Yagisawa, H. e Hirata, H. (1995) A novel insertion sequence (IS)-like element of the thermophilic bacterium PS3 promotes expression of the alanine carrier protein-encoding gene. *Gene*, 163, 103-107.

Nagy, E. (2010) Anaerobic Infections: Uptake on Treatment Considerations. *Drugs*, 70, 841-858.

Narayanan, L. L. e Vaishnavi, C. (2010) Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*, 13, 233-9.

Neves, M. C., Júnior, O. D. R., Alves, E. C. C. e Lemos, M. V. F. (2007) Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arq Inst Biol*, 74, 207-213.

Niederman, R., Zhang, J. e Kashket, S. (1997) Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8, 269-90.

Noble, H. W. (2000) A delight in the anatomy of teeth. *The Lancet*, 356, 2107.

Ohtsubo, E. e Sekine, Y. (1996) Bacterial Insertion Sequences. IN SAEDLER, H. & GIERL, A. (Eds.) *Transposable Elements*. Springer Berlin Heidelberg.

Oliveira, J. C. M. e Uzeda, L. A. D. M. (2010) Antibióticos sistêmicos em Endodontia: novos conceitos. *Rev. bras. odontol.*, 67, 247-254.

Opsahl Vital, S., Gaucher, C., Bardet, C., Rowe, P. S., George, A., Linglart, A. e Chaussain, C. (2012) Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone*, 50, 989-997.

Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E. e Iredell, J. R. (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*, 33, 757-84.

Passarge, E. (2004) *Genética: Texto e Atlas*, Porto Alegre.

Pereira-Maia, E. C., Silva, P. P., Almeida, W. B., Santos, H. F., Marcial, B. L., Ruggiero, R. e Guerra, W. (2010) Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. *Quim. Nova*, 33, 700-706.

Pitout, J. D., Sanders, C. C. e Sanders, W. E., Jr. (1997) Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *Am J Med*, 103, 51-9.

Porwollik, S. e McClelland, M. (2003) Lateral gene transfer in Salmonella. *Microbes Infect*, 5, 977-89.

Ribeiro, A. C., Matarazzo, F., Faveri, M., Zzell, D. M. e Mayer, M. P. A. (2011) Exploring Bacterial Diversity of Endodontic Microbiota by Cloning and Sequencing 16S rRNA. *Journal of Endodontics*, 37, 922-926.

Rôças, I. N. e Siqueira Jr, J. F. (2012) Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe*, 18, 576-580.

Rôças, I. N., Siqueira Jr, J. F. e Santos, K. R. N. (2004) Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. *Journal of Endodontics*, 30, 315-320.

Rodriguez-Noriega, E. e Seas, C. (2010) Padrão de mudança de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina na América Latina: implicações para a prática clínica na região. *Braz J Infect Dis*, 14, S87-S96.

Roe, D. E., Weinberg, A. e Roberts, M. C. (1996) Mobile rRNA methylase genes coding for erythromycin resistance in *Actinobacillus actinimycetemcomitans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37, 457-464.

Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E. e Harry, M. (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18, 47-60.

Rowe-Magnus, D. A. e Mazel, D. (1999) Resistance gene capture. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 483-488.

Rowe-Magnus, D. A. e Mazel, D. (2001) Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 565-569.

Schein, B. e Schilder, H. (2006) Endotoxin Content in Endodontically Involved Teeth. *Journal of Endodontics*, 32, 293-295.

Sedgley, C. M., Lee, E. H., Martin, M. J. e Flannagan, S. E. (2008) Antibiotic Resistance Gene Transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in Root Canals of Teeth Ex Vivo. *Journal of Endodontics*, 34, 570-574.

Sekiguchi, R. T., Fukuda, C. T., Damante, C. A., De Micheli, G. e Lotufo, R. F. M. (2007) Alerta à resistência antibiótica em periodontia. *Revista de Odontologia da UNESP*, 36, 299-304.

Shah, H. N. e Collins, D. M. (1990) *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol*, 40, 205-8.

Shen, S., Samaranayake, L. P. e Yip, H.-K. (2004) In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *Journal of Dentistry*, 32, 667-678.

Shendruk, T. N., Hickey, O. A., Slater, G. W. e Harden, J. L. (2012) Electrophoresis: When hydrodynamics matter. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17, 74-82.

Silva, B. M., Tomazinho, F. S. F., Anele, J. A., Leonardi, D. P. e Filho, F. B. (2010) A ação do hidróxido de cálcio frente ao *enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical secundária. *Odonto*, 18, 95-105.

Silva, J. (1996) Mechanisms of antibiotic resistance. *Current Therapeutic Research*, 57, 30-35.

Siqueira Jr, J. F. (2002) Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 94, 281-293.

Siqueira Jr, J. F. e Rôças, I. N. (2003) PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of Dentistry*, 31, 333-339.

Siqueira Jr, J. F. e Rôças, I. N. (2005a) Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1 - Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. *Journal of Endodontics*, 31, 411-423.

Siqueira Jr, J. F. e Rôças, I. N. (2005b) Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2—Redefining the Endodontic Microbiota. *Journal of Endodontics*, 31, 488-498.

Siqueira Jr, J. F. e Sen, B. H. (2004) Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97, 632-641.

Sixou, J. L., De Medeiros-Batista, O. e Bonnaure-Mallet, M. (1996) Modifications of the microflora of the oral cavity arising during immunosuppressive chemotherapy. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, 32, 306-310.

Skucaite, N., Peciuliene, V., Vitkauskiene, A. e Machiulskiene, V. (2010) Susceptibility of Endodontic Pathogens to Antibiotics in Patients with Symptomatic Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, 36, 1611-1616.

Soares, G. M. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P. M. e Feres, M. (2012) Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci* 20, 295-309.

Sousa, J. C. (2001) *Antibióticos Antibacterianos*. Lisboa, Farmácias Portuguesas.

Sousa, J. C. (2006) *Manual de Antibióticos Antibacterianos*, Porto, Fundação Fernando Pessoa.

Speer, B. S., Shoemaker, N. B. e Salyers, A. A. (1992) Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 387-399.

Sunde, P. T., Olsen, I., Debelian, G. J. e Tronstad, L. (2002) Microbiota of Periapical Lesions Refractory to Endodontic Therapy. *Journal of Endodontics*, 28, 304-310.

Sunde, P. T., Tronstad, L., Eribe, E. R., Lind, P. O. e Olsen, I. (2000) Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol*, 16, 191-6.

Sundqvist, G., Carlsson, J., Herrmann, B. e Tarnvik, A. (1985) Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented Bacteroides. *J Med Microbiol*, 19, 85-94.

Sweeney, L. C., Dave, J., Chambers, P. A. e Heritage, J. (2004) Antibiotic resistance in general dental practice—a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 567-576.

Tang, G., Yip, H.-K., Samaranayake, L. P., Chan, K.-Y., Luo, G. e Fang, H. H. P. (2004) Direct detection of cell surface interactive forces of sessile, fimbriated and non-fimbriated *Actinomyces* spp. using atomic force microscopy. *Archives of Oral Biology*, 49, 727-738.

Tang, Y.-W., Procop, G. W. e Persing, D. H. (1997) Molecular diagnostics of infection diseases. *Clinical Chemistry*, 43:11, 2021-2038.

Tenover, F. C. (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, S3-S10.

Thomas, C. M. e Nielsen, K. M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3, 711-21.

Thomas, T. e Thomas, T. J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 58, 244-58.

Tian, B., Fadhil, N. H., Powell, J. E., Kwong, W. K. e Moran, N. A. (2012) Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *ASM Journals*, 3, 1-7.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. e Ike, Y. (1997) Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *Journal of bacteriology*, 179, 7843-7855.

Torabinejad, M., Kutsenko, D., Machnick, T. K., Ismail, A. e Newton, C. W. (2005) Levels of Evidence for the Outcome of Nonsurgical Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics*, 31, 637-646.

Torabinejad, M., Ung, B. e Kettering, J. D. (1990) In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics*, 16, 566-569.

Valarini, N., Doi, R. K., Maciel, S. M. e Poli-Frederico, R. C. (2011) Biologia molecular na odontologia: métodos comumente utilizados na cariologia. *Odontol.Clin.-Cient.*, 10, 19-23.

Valero, M., Perez-Revuelta, B. I. e Rodriguez, L. J. (2003) Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:beta-ciclodextrin complex. *Int J Pharm*, 253, 97-110.

Van Elsas, J. D. e Bailey, M. J. (2002) The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol*, 42, 187-97.



Wade, W. (2002) Unculturable bacteria--the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med*, 95, 81-3.

Wang, J. E., Jorgensen, P. F., Almlof, M., Thiemermann, C., Foster, S. J., Aasen, A. O. e Solberg, R. (2000) Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun*, 68, 3965-70.

Weller, T. M. A. e Jamieson, C. E. (2004) The expanding role of the antibiotic pharmacist. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 295-298.

Wu, H.-J., Wang, A. H. J. e Jennings, M. P. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 93-101.

Zhong, P., Pratt, S. D., Edalji, R. P., Walter, K. A., Holzman, T. F., Shivakumar, A. G. e Katz, L. (1996) Substrate requirements for ErmC' methyltransferase activity. *J. Bacteriology*, 177, 4327-4332.