



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO BIOMÉDICO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Fanor Marques de Almeida Júnior

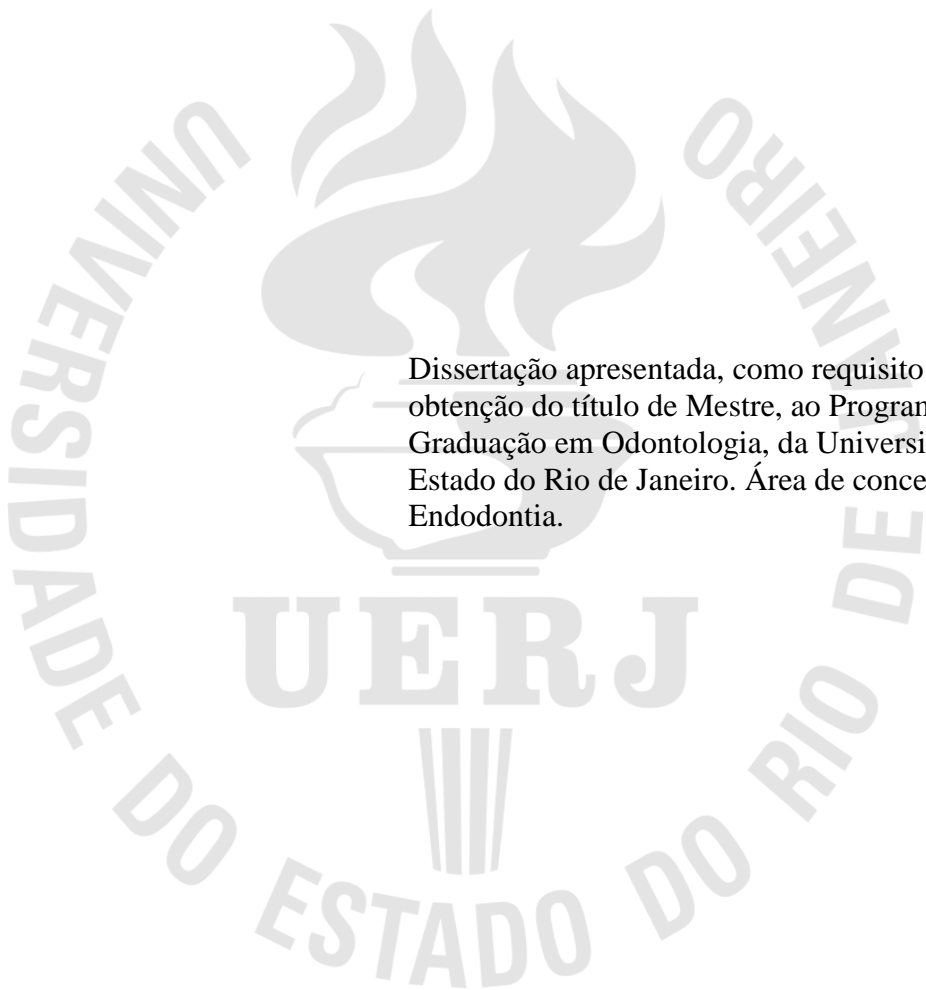
**Perfil microbiano de infecções endodônticas primárias e sua relação com o tamanho de lesões periradiculares associadas**

Rio de Janeiro

2013

Fanor Marques de Almeida Júnior

**Perfil microbiano de infecções endodônticas primárias e sua relação com o volume de lesões periradiculares associadas**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Moura Sassone  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Rivera Fidel

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

A447 Almeida Júnior, Fanor Marques de.  
Perfil microbiano de infecções endodônticas primárias e sua relação com tamanho de lesões periradiculares associadas/ Fanor Marques de Almeida Júnior. – 2013.  
86 f.

Orientadora: Luciana Moura Sassone.  
Coorientadora: Sandra Fidel.  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Bactérias. 2. Sondas DNA. 3. Periodontite Periapical. 4. Boca - Infecções. I. Sassone, Luciana Moura. II. Fidel, Sandra. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU  
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Fanor Marques de Almeida Júnior

**Perfil microbiano de infecções endodônticas primárias e sua relação com o volume de lesões periradiculares associadas**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovado em dezanove de dezembro de dois mil e treze

Orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Moura Sassone  
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Fidel  
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgiana Amaral  
Faculdade de Odontologia – UERJ

---

Prof. Dr. Marcelo de Faveri  
Faculdade de Odontologia - Universidade de Guarulhos

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha mãe Célia, por me colocar no caminho certo, por ser meu pai e minha mãe nos momentos necessários e por ser minha melhor amiga em todos os outros momentos. As coisas boas que eu realizo na minha vida, tem o intuito único de fazer com que você tenha orgulho de mim, assim como eu tenho de você. Eu te amo.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, sem ele nada disso seria possível.

A minha esposa Bianca, por sua paciência, carinho, atenção e compreensão nesses momentos de ausência. Eu te amo. Muito obrigado por me incentivar a ser uma pessoa melhor todo o tempo.

Ao meu filho Dante, que chegou em meio a esse turbilhão de emoções e se mostrou um bebê maravilhoso, compreensivo e sério, extremamente sério, tão novo e tão observador.

Aos pacientes que colaboraram com este estudo, vocês foram a força motora desse trabalho, sem vocês não haveria trabalho.

A minha orientadora, professora Luciana Sassone. Conviver com você esses anos foi inspirador; você é exemplo, como professora, orientadora, mãe, cidadã. Poucas vezes na minha vida tive a oportunidade de conviver com alguém tão ética e correta como você. O sentimento que você desperta nas pessoas é de admiração, qualidades como sinceridade, ética, exigência e perfeccionismo são capazes de transformar simples alunos em ótimos professores, pesquisadores e cidadãos. Obrigado por partilhar essas qualidades comigo e fazer com que eu crescesse um pouco também.

Aos professores Rivail Antônio Sérgio Fidel e em especial a minha também orientadora Sandra Rivera Fidel. Agradeço pelo incentivo e apoio durante todo o curso de mestrado, por me receberem de braços abertos na UERJ e se disponibilizarem a me ajudar em tudo que eu necessitei nesses anos,.

A Odontoclínica Central da Aeronáutica, nas pessoas da Major Dentista Rosana Miranda, chefe da Seção de Endodontia da Odontoclínica de Aeronáutica Santos Dumont muito obrigado por abrir as portas da Aeronáutica à nossa pesquisa e colocar todos os recursos disponíveis a nossa utilização e, da Tenente Dentista Marília Marceliano-Alves, suas observações e sua ajuda foram essenciais para a que esse trabalho fosse completo. Muito obrigado.

Aos amigos Tatiane Mello, Aurimar Andrade, Renata Ximenes, Marcio Salles e Georgiana Amaral por serem meus primeiros incentivadores dentro da UERJ, ao amigo de longa data e exemplo a ser seguido Emmanuel Nogueira.

A Universidade de Guarulhos (UnG) pela utilização de suas instalações e recursos.

As professoras da pós-graduação da UnG Magda Feres e Luciene Figueiredo pela oportunidade do desenvolvimento deste estudo em seu laboratório.

Ao professor Marcelo de Faveri, pela paciência e grande ajuda na análise estatística do trabalho.

A técnica Izilvânia Barreto pela execução do teste.

Aos meus amigos do mestrado, Ane Poly, Felipe Belladonna, João Marcelo, Justine Monnerat e Marcus Andrade, vocês fizeram esse tempo passar mais rápido. Graças ao nosso convívio desenvolvemos uma afinidade e um companheirismo muito grande, espero que nossa relação dure muitos anos e possamos publicar muitas coisas juntos.

A técnica Patrícia Mayer, pelo auxílio técnico e boas horas de convívio.

A professora Teresa Berlinck, por me ajudar a crescer como professor, e como profissional, a me incentivar a melhorar a cada dia e a lidar com as dificuldades da alma humana em alguns casos de trauma.

Ao professor Paulo Aloísio Egreja, agradeço pelos bons momentos de convivência nas clínicas e as ótimas conversas e visões de vida que só o peso da experiência trás.

Ao doutorando Fernando Marques muito paciente comigo nos casos de trauma e em todos esses períodos na clínica de endodontia.

Aos funcionários da FO-UERJ José Ângelus de Mendonça, um amigo que eu fiz ao longo desses anos, a Denise Pinheiro Muniz da Cruz, Patricia Chiavazzoli da Costa Cerqueira e Renata Souza do Carmo pela atenção e cooperação.

Aos meus irmão e cunhados pelos momentos de descontração e possivelmente os responsáveis por eu não ter terminado antes.

Ao meu pai, Fanor, que infelizmente não está aqui para partilhar esse momento, mas que nunca esteve ausente, um segundo sequer dos meus pensamentos.

Agradecimento especial à Fundação Carlos Chagas de Amparo a Pesquisa (FAPERJ), a bolsa recebida.

Se queres vencer o mundo, vence primeiro a ti mesmo.

*Fiódor Dostoiévski*



## RESUMO

ALMEIDA JÚNIOR., Fanor Marques. **Perfil microbiano de infecções endodônticas primárias e sua relação com o tamanho de lesões periradiculares associadas.** 2013. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O presente trabalho tem por objetivo investigar a microbiota de canais radiculares que apresentem lesão perirradicular e relacionar o perfil microbiano detectado com a área/volume destas lesões visualizadas por radiografias periapicais e tomografias computadorizadas tipo cone-beam. Foram selecionados 19 dentes com infecção endodôntica primária. As amostras microbiológicas foram coletadas dos canais com o auxílio de limas tipo Hedström e cones de papel absorvente estéril. A técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi utilizada para detecção de até 79 espécies bacterianas em cada amostra, utilizando sondas de DNA específicas. Os dados microbiológicos foram expressos em percentagem média (prevalência), proporção e nível médio de cada espécie em cada amostra. Os testes *t* independente e de correlação de Pearson foram usados para correlacionar a contagem das bactérias testadas com os dados clínicos ( $p \leq 0,05$ ). Foi encontrada uma média de 17 espécies por amostra. *E. brachy* (70%), *S. pneumonia* (67,5%), *P. oris* (67,5%), *E. faecium* (65%), *N. gonorrhoeae* (62,5%), *K. pneumoniae* (62,5%), *P. melaninogenica* (62,5%), *P. nigrescens* (62,5%) e *P. micra* (62,5%) foram as espécies mais prevalentes, e as espécies encontradas em níveis médios mais altos foram *P. oris* ( $7,5 \times 10^5$ ), *E. brachy* ( $7,3 \times 10^5$ ), *E. faecium* ( $7,2 \times 10^5$ ), *K. pneumoniae* ( $7,0 \times 10^5$ ), *N. gonorrhoeae* ( $6,8 \times 10^5$ ), *S. epidermidis* ( $6,5 \times 10^5$ ) e *H. pylori* ( $6,5 \times 10^5$ ). Houve correlação positiva entre as lesões periapicais de maior área e contagens significativamente mais altas da carga bacteriana total e de bactérias Gram-negativas ( $p < 0,05$ ). Baseado nos resultados obtidos é possível concluir que a microbiota presente em dentes com periodontite apical primária possui perfil misto e complexo, e que uma maior tamanho de lesão perirradicular pode estar associada a contagem elevada espécie totais e bactérias Gram-negativas.

Palavras-chave: Bactérias. Sondas de DNA. Periodontite periapical.

## ABSTRACT

ALMEIDA JÚNIOR, Fanor Marques. **Microbial profile of primary endodontic infections and their relation to the size of the periapical lesions.** 2013. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The present study aims to investigate the microbiota of root canals presenting periapical lesions and to relate the microbial pattern detected with the area/volume of these lesions visualized by periapical radiographs and micro tomography cone beam type. Nineteen teeth with primary endodontic infection were selected. Microbiological samples were collected with the aid of type files Hedströen and sterile paper points from the root canal. The technique of *DNA-DNA hybridization checkerboard* was used to detect up to 79 bacterial species in each sample using specific DNA probes. Microbiological data were expressed as mean prevalence, proportions and levels of each species in each sample. The *t* independent and Pearson correlation tests were used to correlate the count of the bacteria tested with clinical data ( $p \leq 0.05$ ). An average of 17 species per sample were found. *E. Brachy* (70%), *S. pneumonia* (67.5%), *P. oris* (67.5 %), *E. faecium* (65%), *N. gonorrhoeae* (62.5%), *K pneumoniae* (62.5%), *P. melaninogenica* (62.5%), *P. nigrescens* (62.5%) and *P. micros* (62.5 %) were the most prevalent species, and the species found at higher counts were *P. oris* ( $7.5 \times 10^5$ ), *E. Brachy* ( $7.3 \times 10^5$ ), *E. faecium* ( $7.2 \times 10^5$ ), *K. pneumoniae* ( $7.0 \times 10^5$ ), *N. gonorrhoeae* ( $6.8 \times 10^5$ ), *S. epidermidis* ( $6.5 \times 10^5$ ) and *H. pylori* ( $6.5 \times 10^5$ ). A positive correlation was found between higher amount of total species and Gram-negative bacterias and periapical lesions with highest areas ( $p < 0.05$ ). Based on these results it may be concluded that the microbiota present in teeth with periapical periodontitis presents mixed and complex profile and that a larger size of periapical lesions may be associated with high total species counts and Gram-negative bacterias.

Keywords: Bacteria. DNA Probes. Periapical Periodontitis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Radiografia periapical de uma amostra do estudo.....	40
Figura 2 – Tomografia Cone Beam de uma amostra do estudo.....	41
Figura 3 – Etapas da coleta.....	43
Figura 4 - Fotografia da montagem do <i>Minislot</i> 30 <sup>®</sup> com a colocação da membrana de <i>nylon</i> .....	45
Figura 5 - Fotografia da colocação das amostras de infecções endodônticas nas canaletas do <i>Minislot</i> 30 <sup>®</sup> , sobre a membrana de <i>nylon</i> .....	45
Figura 6 - Fotografia do <i>Miniblotter</i> 45 <sup>®</sup> .....	46
Figura 7 - Fotografia da colocação das sondas de DNA perpendicularmente as amostras já previamente fixadas, na membrana de <i>nylon</i> , no <i>Miniblotter</i> 45 <sup>®</sup> .....	46
Figura 8 - Representação gráfica do padrão de hibridização das sondas de DNA com as bactérias presentes nas amostras dos canais radiculares em forma de tabuleiro de xadrez.....	49

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Prevalência (A), contagem ( $\times 10^5$  células bacterianas) dos níveis médios (B) e proporção média das sondas de DNA bacteriano (C) das 79 espécies bacterianas presentes nas 19 amostras avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de prevalência..... 53
- Gráfico 2 – Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas por forma..... 54
- Gráfico 3 – Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas pela coloração de Gram..... 55
- Gráfico 4 – Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas pelo metabolismo respiratório..... 55
- Gráfico 5 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas por gênero..... 56
- Gráfico 6 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas por filo..... 57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano.....	47
Tabela 2 -	Índice utilizado para determinação do nível de micro-organismos nas amostras dos canais radiculares e seus valores numéricos correspondentes.....	49
Tabela 3 -	Dados dos pacientes.....	79
Tabela 4 -	Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes.....	80
Tabela 5 -	Classificação das 79 espécies bacterianas em relação a sua forma.....	81
Tabela 6 -	Classificação das 79 espécies bacterianas em relação à coloração de Gram.....	82
Tabela 7 -	Classificação das 79 espécies bacterianas em relação ao metabolismo respiratório.....	83
Tabela 8 -	Classificação das 79 espécies bacterianas em relação ao gênero.....	84
Tabela 9 -	Classificação das 79 espécies bacterianas em relação ao Filo.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. gerencseriae</i>	<i>Actinomyces gerencseriae</i>
<i>A. israelii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>A. meyeri</i>	<i>Actinomyces meyeri</i>
<i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 2
<i>A. odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>A. oris</i>	<i>Actinomyces oris</i>
<i>A. actinomycetencomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetencomitans</i> serotypes a
<i>A. aphrophilus</i>	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>
<i>A. geminatus</i>	<i>Anaerobus geminatus</i>
<i>A. rimae</i>	<i>Atopobium rimae</i>
<i>B. assacharolyticus</i>	<i>Bacteroides assacharolyticus</i>
<i>B. endodontalis</i>	<i>Bacteroides endodontalis</i>
<i>B. forsythus</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. gingivalis</i>	<i>Bacteroides gingivalis</i>
<i>B. intermedius</i>	<i>Bacteroides intermedius</i>
<i>B. melaninogenicus</i>	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>
<i>B. oralis</i>	<i>Bacteroides oralis</i>
<i>B. ruminicola</i>	<i>Bacteroides ruminicola</i>
<i>B. uerolyticus</i>	<i>Bacteroides ureolyticus</i>
BPPN	Bacilos Produtores de Pigmento Negro
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. gracilis</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. showae</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>C. sputorum</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
<i>C. gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>

<i>C. ochracea</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
<i>C. sputigena</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
<i>C. matruchotii</i>	<i>Corynebacterium matruchotii</i>
<i>D. invisus</i>	<i>Dialister invisus</i>
<i>D. pneumosintes</i>	<i>Dialister pneumosintes</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. gergoviae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>
<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. alantolyticum</i>	<i>Eubacterium alantolyticum</i>
<i>E. infirmum</i>	<i>Eubacterium infirmum</i>
<i>E. limosum</i>	<i>Eubacterium limosum</i>
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
<i>E. saburreum</i>	<i>Eubacterium saburreum</i>
EPM	Erro Padrão da Média
<i>F. alocis</i>	<i>Filifactor alocis</i>
<i>F. fusiforme</i>	<i>Fusobacterium fusiforme</i>
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum</i>
<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp polymorphum</i>
<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp vincentii</i>
<i>F. periodonticum</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>F. varium</i>	<i>Fusobacterium varium</i>
<i>G. morbillorum</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. buccalis</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>

<i>M. curtissii</i>	<i>Mobiluncus curtissii</i>
<i>N. hematococca</i>	<i>Nectria hematococca</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>N. mucosa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>N. polysaccharea</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>N. sicca</i>	<i>Neisseria sicca</i>
NaOCl	Hipoclorito de sódio
<i>O. Uli</i>	<i>Olsenella Uli</i>
<i>P. morbillorum</i>	<i>Peptococcus morbillorum</i>
<i>P. anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>P. stomatis</i>	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>P. endodontalis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. buccae</i>	<i>Prevotella buccae</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>P. oralis</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>P. acnes I</i>	<i>Propionibacterium acnes I</i>
<i>P. alactolyticus</i>	<i>Propionibacterium alactolyticus</i>
<i>P. propionicum</i>	<i>Propionibacterium propionicum</i>
<i>P. alactolyticus</i>	<i>Pseudomonas alactolyticus</i>
<i>P. acidifaciens</i>	<i>Propionibacterium acidifaciens</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> — Reação em cadeia da polimerase
<i>R. dentacariosa</i>	<i>Rothia dentacariosa</i>
<i>S. noxia</i>	<i>Selenomonas noxia</i>
<i>S. sputigena</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>



<i>S. margescens</i>	<i>Serratia margescens</i>
<i>S. ixodetis</i>	<i>Spiroplasma ixodetis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>S. anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>S. genomospecies C8</i>	<i>Streptococcus genomospecies C8</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. penumonia</i>	<i>Streptococcus penumonia</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. moorei</i>	<i>Solobacterium moorei</i>
<i>S. oral clone BA 121</i>	<i>Synergistes oral clone BA 121</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. maltophilum</i>	<i>Treponema maltophilum</i>
<i>T. socranskii</i>	<i>Treponema socranskii</i>
TE	Tampão Tris EDTA
<i>V. fluvialis</i>	<i>Vagococcus fluvialis</i>
<i>V. dispar</i>	<i>Veillonella dispar</i>
<i>V. parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>V. nereis</i>	<i>Vibrio nereis</i>

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2	<b>OBJETIVOS E METAS</b> .....	38
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
3.1	<b>Seleção da amostra e Desenho Experimental</b> .....	39
3.2	<b>Exame Clínico e Radiográfico</b> .....	39
3.3	<b>Exame Tomográfico</b> .....	40
3.4	<b>Avaliação Microbiológica</b> .....	42
3.4.1	<u>Coleta das Amostras</u> .....	42
3.4.2	<u>Identificação e prevalência pelo método do <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i></u> .....	43
3.4.3	<u>Detecção das Espécies</u> .....	48
3.5	<b>Análise dos Dados</b> .....	50
4	<b>RESULTADOS</b> .....	51
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
	<b>APÊNDICE A</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	74
	<b>APÊNDICE B</b> – Anamnese.....	75
	<b>APÊNDICE C</b> – Anamnese odontológica.....	78
	<b>APÊNDICE D</b> – Dados dos pacientes.....	79
	<b>APÊNDICE E</b> – Sinais e sintomas.....	80
	<b>APÊNDICE F</b> – Classificação das 79 espécies bacterianas.....	81
	<b>ANEXO</b> – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	86

## INTRODUÇÃO

Quando bactérias acometem a polpa dentária, tem início um processo inflamatório agudo e inespecífico, que independe da etiologia do agente agressor. Esta resposta tem como objetivo localizar e eliminar o antígeno, remover os tecidos degenerados e possibilitar o reparo tecidual da área afetada. Assim iniciam-se uma série de eventos vasculares, para possibilitar a chegada de células de defesa a região afetada. O aumento da permeabilidade vascular, a quimiotaxia e o exsudato inflamatório fazem com que neutrófilos e monócitos cheguem a área acometida. Tais células são responsáveis pela fagocitose de bactérias, complexos imunológicos e tecidos necróticos. Dependendo da intensidade do agressor o antígeno é eliminado e os tecidos são reparados. Caso contrário, os micro-organismos colonizam o sistema de canais radiculares e uma inflamação crônica é instalada, com o envolvimento dos linfócitos T e B, especificamente voltados para a eliminação do agente agressor persistente (NAIR, 1987; TRONSTAD et al., 1990).

Uma vez que na cavidade oral, há uma estimativa de  $10^{10}$  células bacterianas (MIMS et al., 1995) consistindo em mais de setecentas espécies diferentes de micro-organismos (GOMES, et al., 2005; MOORE; MOORE, 1994; PASTER et al., 2001; RÔÇAS; SIQUEIRA JR., 2012; SIQUEIRA JR. et al., 2007), é de se esperar que nos casos onde este processo inflamatório evolua para a necrose do tecido, ocorra a instalação de um processo infeccioso. A microbiota seria composta por um grupo restrito de micro-organismos, selecionados por pressões ambientais de anaerobiose, nutrição e competição com outras espécies que colonizam este sistema. Estes se organizam por meio de um agregado bacteriano em uma matriz extracelular, chamado de biofilme endodôntico. As infecções endodônticas primárias são geralmente compostas por uma mistura polimicrobiana com proporções aproximadamente iguais de espécies Gram-positivas e Gram-negativas, dominados por anaeróbios estritos (FIGDOR; SUNDQVIST, 2007; RÔÇAS et al., 2008). Enquanto as camadas de esmalte e cimento estão intactas, a polpa e o sistema de canais radiculares são protegidos contra tentativa de estabelecimento destes. Mas a perda dessas estruturas por cárie, trincas ou trauma abre uma via de comunicação para a penetração de bactérias através dos túbulos dentinários, oprimindo a resposta imune da polpa e favorecendo a colonização nesse novo ambiente encontrado (FIGDOR; SUNDQVIST 2007).

Em 1894, Miller, foi o primeiro a associar bactérias a periodontite apical. Em concordância, Kakehashi et al. em 1965, comprovaram o papel das bactérias no

desenvolvimento das lesões perirradiculares. Sundqvist, em 1976 demonstrou que na ausência de infecção, o tecido pulpar necrosado não poderia induzir e perpetuar lesões de periodontite apical. Möller et al., em 1981, ratificaram a necessidade da presença de micro-organismos para o desenvolvimento de periodontite apical.

Há uma tendência de se associar o tamanho e o volume da lesão perirradicular, com o número de células e espécies bacterianas dentro do sistema de canais radiculares (SUNDQVIST, 1992); conhecer essa microbiota é essencial para o bom entendimento do processo patológico perirradicular, buscando esse entendimento. Figdor e Sundqvist (2007), relataram que a periodontite apical é um processo inflamatório em torno do ápice radicular, e lesão que ali se instala trata-se essencialmente de uma seqüela de uma infecção microbiana do espaço pulpar. Siqueira Jr., et al., (2007), afirmou que a periodontite apical é uma doença infecciosa causada por micro-organismos que infectam o canal radicular e uma série de micro-organismos estão envolvidos nos estágios iniciais de invasão do tecido pulpar, que pode culminar com a inflamação e mais necrose do mesmo, a resposta inflamatória a essa lesão pode resultar em uma lesão periapical (SIQUEIRA JR.; RÔÇAS, 2008).

Anteriormente as técnicas mais utilizadas para a identificação desta microbiota, como a cultura, eram menos abrangentes, uma vez que, algumas bactérias são extremamente difíceis de serem mantidas em laboratório após a coleta (PETTI et al., 2005). Por outro lado a técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization que foi preconizada por Socransky et al., (1994), oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de micro-organismos de desenvolvimento lento, nutricionalmente exigentes. Essa técnica tem sido empregada em diversas áreas da Odontologia como a Periodontia (TELES et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; FAVERI et al., 2009) e a Endodontia (SASSONE et al., 2007; SIQUEIRA JR., 2001; SIQUEIRA JR.; RÔÇAS, 2009 ; VIANNA et al., 2008). Trata-se de um método de fácil manuseio, que possibilita a identificação e a quantificação de espécies alvo, que requer um curto espaço de tempo para a sua execução e possui baixo custo em comparação a outras técnicas de diagnóstico microbiológico (MORAES et al., 2002; SIQUEIRA JR.; RÔÇAS, 2004).

Mediante o exposto, fica clara a importância do conhecimento qualitativo e quantitativo desta microbiota para a busca de uma possível relação entre esta e o tamanho das lesões perirradiculares de origem endodôntica, e uma vez que diagnósticos obtidos de tomografias cone beam podem diferir completamente de diagnósticos baseados em radiografias (BORNSTEIN, et al., 2009; SCHULZE et al., 2004; YAMAMOTO, 2003) e a tomografia permite avaliar melhor casos com extensas lesões e sua relação espacial com os

marcos anatômicos importantes (COTTI et al., 1999; LAMBRIANDINIS, 1985), buscamos não só avaliar radiograficamente, mas também tomograficamente, pois não foram encontrados na literatura estudos que fizessem essa comparação.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

Miller (1894), sugeriu a correlação direta entre a ocorrência de alterações pulpare e a presença de bactérias. Ele foi o primeiro pesquisador a sugerir tal associação, além de ter observado que muitas bactérias não foram passíveis de cultivo pelas técnicas disponíveis na época e salientou ainda a importância desses conhecimentos na compreensão e tratamento dos processos patológicos dos tecidos periapicais.

Brown Jr. e Rudolph (1957), avaliaram a microbiota de 70 canais radiculares de dentes que não apresentavam exposição pulpar, cáries profundas, defeitos anatômicos, restaurações extensas, doença periodontal ou história de trauma. Foram realizadas culturas em aerobiose e anaerobiose em meios: ágar sangue, ágar chocolate, ágar PPLO, ágar Sabouraud, ágar fusiforme e caldo tioglicolato. A suspensão bacteriana remanescente foi avaliada por microscopia de contraste/fase e em campo escuro. Pela observação direta foi possível a detecção de micro-organismos em 90% dos casos, esse estudo revelou a presença de espiroquetas. Por meio da técnica de cultura foi possível identificar: 51,3% de anaeróbios facultativos, 23,9% de anaeróbios estritos e 23,9% de aeróbios nos canais radiculares infectados.

Takehashi et al. (1965), compararam as alterações resultantes de exposições pulpare não tratadas em ratos *germ-free* e em ratos portadores de microbiota convencional. As exposições foram feitas por meio de perfuração na superfície oclusal do primeiro molar superior direito. Após intervalos operatórios, variando de 1 a 42 dias, os animais foram mortos e suas polpas examinadas. Após um intervalo de oito dias, foi observado tecido pulpar vivo somente na região apical dos canais radiculares dos ratos convencionais. Em geral, após o oitavo dia de experimento, ocorreu necrose no tecido pulpar na presença de bactérias, resultando no desenvolvimento de lesões perirradiculares crônicas. Nos animais *germ-free*, no entanto, não foram observados necrose pulpar, granuloma apical ou abscessos. Ainda, independente do tamanho da exposição pulpar, houve formação de tecido mineralizado sobre a polpa exposta, a partir de 14 dias, com pontes de tecido mineralizado completas entre o 21º e o 28º dia. Estes resultados, mesmo em face de modificações alimentares, indicam que a presença ou ausência de infecção é o principal fator determinante na cicatrização de polpas roedores expostas.

Melville e Birch (1967), estudaram a microbiota dos canais radiculares e do tecido

perirradicular de dentes sem vitalidade pulpar. Foram realizadas coletas do interior dos canais radiculares e do tecido perirradicular de 104 incisivos, sendo 27 já tratados endodonticamente e com indicação de cirurgia parendodôntica. A coleta foi realizada por meio de uma técnica asséptica, em que o dente foi desinfetado com pedra pomes antes da colocação do lençol de borracha, e após a colocação, o lençol e o dente isolado foram desinfetados com tintura de iodo (25%), durante três minutos. O canal foi acessado com instrumentos esterilizados e a microbiota do canal foi coletada com pontas de papel esterilizadas. Foram realizadas apicectomias apenas de dentes anteriores e para obtenção da amostra bacteriológica da área perirradicular, dois esfregaços foram colhidos da superfície da mucosa do campo operatório. A maioria das bactérias isoladas dos canais foram estreptococos e com menor frequência estafilococos. Os autores concluíram que para um estudo microbiológico da região perirradicular, seria essencial tanto cultura aeróbia quanto anaeróbia e que, mesmo em presença de bactérias no canal radicular, a região perirradicular pode permanecer esterilizada. No entanto, geralmente a microbiota perirradicular é idêntica à microbiota presente no interior do canal radicular.

Kantz e Henry (1974), coletaram, em ambiente de anaerobiose, amostras de 24 dentes com necrose pulpar de humanos com câmaras pulpares fechadas de vinte pacientes. O meio RTF foi introduzido no canal radicular, instrumentou-se com limas tipo Hédstrom, e aproximadamente um mililitro (1 ml) do conteúdo do canal foi aspirado por meio de uma seringa esterilizada. Foram isolados 377 micro-organismos sendo destes 104 anaeróbios. Os mais comumente observados foram *Actinomyces israelii*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sputorum*, *Eubacterium alantolyticum*, *Fusobacterium fusiforme*, *Fusobacterium varium*, *Peptococcus morbillorum*, *Propionibacterium acnes* e *Veillonella parvula*.

Sundqvist (1976), avaliou 32 dentes unirradiculares sem vitalidade pulpar e câmaras pulpares não expostas, de 27 pacientes. Os dentes não apresentavam lesão de cárie, restaurações ou alterações anatômicas, e a perda da vitalidade pulpar era decorrente de trauma dentário. Foram isoladas bactérias de 18 dos 19 dentes que apresentavam lesão perirradicular visível radiograficamente. Destes, a maior parte continha mais de uma espécie bacteriana. Em alguns dentes, puderam ser isoladas até oito cepas e no total foram isoladas 88. Os resultados mostraram o papel fundamental dos micro-organismos na etiologia e desenvolvimento das lesões perirradiculares. Apenas cinco das 88 cepas encontradas cresceram em ambiente aeróbio, o que comprovou a eficácia dos meios de transporte e cultivo utilizados neste estudo. Foram isolados bactérias dos gêneros *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*,

*Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Campylobacter*.

Zavistoski et al. (1980), descreveram uma técnica quantitativa de cultura de espécies bacterianas endodônticas. As amostras foram coletadas com o auxílio de cones de papel, colocadas em solução salina, e cultivadas quantitativamente, utilizando-se diluições seriadas semeadas em diferentes meios de cultura. O método foi aplicado no estudo da microbiota de dez dentes sem vitalidade pulpar. Uma microbiota mista, com presença de aeróbios e anaeróbios, foi observada em nove amostras, sendo encontradas em média cinco espécies diferentes de micro-organismos por amostra. Por esses resultados, os autores reiteraram o conceito de que as bactérias desempenham um papel significativo no desenvolvimento de patologias pulpares e perirradiculares.

Byström e Sundqvist (1981), avaliaram a presença bacteriana em 15 dentes unirradiculares portadores de polpas necróticas e lesões perirradiculares. Os anaeróbios estritos representavam 88% dos micro-organismos detectados no interior dos canais radiculares, e as espécies mais comumente isoladas foram *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *E. alactolyticum* e *Prevotella intermedia*.

Möller et al. (1981), expuseram o tecido pulpar de dentes de macacos (*Macaca Fascicularis*) ao ambiente bucal (52 dentes), realizaram o selamento coronário destes e os examinaram após seis meses. Foram coletadas amostras microbiológicas destes canais em períodos de sete, noventa e cento e oitenta dias. Foi mostrado que o tecido pulpar necrosado não infectado não induziu reações inflamatórias nos tecidos perirradiculares. Por outro lado, os dentes com polpa infectada mostraram clinicamente reações inflamatórias (12/52 dentes) e sinais radiográficos de comprometimento pulpar (47/52 dentes). 90% dos dentes desenvolveram lesões perirradiculares visíveis radiograficamente, sendo os anaeróbios facultativos e os estreptococos encontrados com maior frequência

Fabricius et al. (1982), analisaram o conteúdo microbiano de 24 canais radiculares infectados de dentes de macacos depois de variados períodos de selamento. Os dentes foram desvitalizados e os canais expostos ao meio bucal por uma semana, sendo posteriormente selados. Coletas microbiológicas foram feitas sete, noventa, cento e oitenta e mil e sessenta dias após o selamento dos dentes. Os autores relataram que após a cobertura das polpas expostas, o percentual de anaeróbios em relação aos aeróbios aumentou com o decorrer do tempo. Um alto percentual de *B. melaninogenicus*, agora denominado *Prevotella melaninogenica* foi encontrado, pelos autores, na região perirradicular. *Prevotella* e *Porphyromonas* se mostraram capazes de induzir abscessos tanto em culturas puras quanto



em associação com outros micro-organismos facultativos.

Fukushima et al. (1990), avaliaram microbiologicamente 21 dentes humanos extraídos com lesão perirradicular visível radiograficamente. Pela observação dos ápices ao microscópio eletrônico de varredura, esses autores localizaram e identificaram as bactérias presentes em canais radiculares de dentes com lesões perirradiculares assintomáticas. Dos 21 dentes observados, 13 apresentaram culturas positivas, sendo 11 mistas e duas puras. Anaeróbios obrigatórios foram obtidos em vinte casos e anaeróbios facultativos em oito. Topograficamente, os micro-organismos encontravam-se no terço apical do canal radicular, entre a porção apical da obturação e o forame apical. Em nenhum dos casos havia bactérias no forame apical ou na porção externa radicular. As infecções eram predominantemente mistas, sendo observados *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium*, todos já isolados anteriormente em casos de infecção endodôntica sintomática.

Baumgartner e Falkler (1991), investigaram a presença bacteriana nos cinco milímetros apicais de canais radiculares infectados. Os dentes utilizados na amostra apresentavam as polpas expostas e lesões perirradiculares contíguas, devido à presença de lesão de cárie. Depois de extraídos, os dentes foram levados a uma câmara de anaerobiose e foi realizada cultura da porção apical das raízes. Além disso, foi realizada cultura em aerobiose. Foi possível a identificação de um total de cinquenta cepas bacterianas, dos dez canais radiculares que fizeram parte da amostra. Do total de micro-organismos isolados, 68% eram anaeróbios estritos.

Sundqvist (1992), investigou a existência de relações comensais ou antagonistas entre micro-organismos nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Foram coletadas amostras de 65 canais radiculares de dentes de humanos e estas analisadas microbiologicamente. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micros*, *P. anaerobius*, *E. alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*. Os resultados reafirmaram o conceito de que há um ambiente especial e seletivo dentro do canal, criado, em parte, pelos relacionamentos de cooperação e de antagonismo entre as bactérias ali presentes.

Hahn e Falkler (1992), identificaram pela primeira vez *Eubacterium brachy* e associaram o achado a infecções primárias. Esse micro-organismo anteriormente era correlacionado a infecções pulmonares (HILL et al., 1987; HOLDEMAN et al., 1980; ROCHEFORD, 1980).

Gomes et al. (1994), estudaram a associação de bactérias específicas com alguns sinais endodônticos e sintomas clínicos. Para isso, foi feito o exame microbiológico de trinta canais

radiculares de pacientes que buscavam tratamento endodôntico sendo 14 relacionados com sintomatologia dolorosa, vinte com sensibilidade à percussão, 23 com presença de exsudato, sete relacionados à edema, cinco com exsudato purulento e quatro com fístula. No total 57 espécies bacterianas diferentes foram encontradas nos canais radiculares. A correlação entre o aspecto clínico e o microbiológico foi observada particularmente com relação à sintomatologia dolorosa, onde os micro-organismos anaeróbios foram isolados em 93% dos canais. Nos casos que não estavam relacionados com dor, a presença de micro-organismos anaeróbios foi de apenas 53%. Os autores afirmaram que existe uma associação significativa entre dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* spp nos canais radiculares.

Socransky et al. (1994), introduziram um novo método para identificação bacteriana que utiliza a hibridação de várias amostras de DNA simultaneamente, cruzando-as com um grande número de sondas de DNA na superfície de uma membrana de *nylon*. A técnica é denominada *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e permite a determinação simultânea da presença bacteriana em múltiplas amostras, realizando-se um único exame.

Assed et al. (1996), avaliaram a presença de *Actinomyces viscosus*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* em materiais coletados do interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica e com presença de lesão perirradicular visível radiograficamente. Para isso, após a coleta do material com cones de papel absorvente esterilizados, o material foi analisado por meio de imunofluorescência indireta. A reação foi positiva em 24 das 25 amostras. A técnica de imunofluorescência indireta apresentou maior eficácia na detecção de bactérias anaeróbias de difícil crescimento, se comparada às técnicas de cultura.

Gomes et al. (1996), procuraram avaliar se uma determinada combinação de bactérias específicas estaria associada à sinais e sintomas endodônticos. O método utilizado pelos autores foi semelhante ao estudo de 1994. Foi realizado o estudo microbiológico de setenta canais radiculares, onde o material coletado com pontas de papel absorventes foi inoculado em quatro diferentes meios sólidos. O mesmo cone de papel também foi utilizado para inocular um meio semi-líquido, não seletivo para anaeróbios. Foram identificadas 65 espécies bacterianas diferentes, sendo que os micro-organismos anaeróbios estritototalizaram 64% das espécies isoladas. Os anaeróbios foram isolados de 70,3% dos casos onde havia dor, confirmando a associação dos anaeróbios com a sintomatologia dolorosa.

Gomes et al. (1996), estudaram as variações na susceptibilidade de componentes da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Amostras microbiológicas foram coletadas de 42 canais radiculares, sendo que foram divididos em dois grupos: grupo 1 que

apresentava dentes sem tratamento endodôntico anterior e grupo 2 que já havia sido submetido a tratamento endodôntico prévio. Foram comparados os achados bacterianos das amostras coletadas antes e após a instrumentação. Houve uma significativa diminuição entre a primeira e a segunda coleta em relação a anaeróbios e a espécies Gram-positivas, especialmente *Peptostreptococcus* spp. Ainda assim, os autores concluíram que certas espécies são mais resistentes a procedimentos biomecânicos que outras.

Chaudhry et al. (1997), avaliou dados clínicos e microbiológicos de 56 pacientes com infecções endodônticas. As amostras foram coletadas usando cones de papel autoclavada. O aeróbio mais comum foi a *Klebsiella pneumoniae*. Antes esse micro-organismo já tinha sido associado a infecções pulmonares e altamente resistente a antimicrobianos (BRADFORD, 2001; SPANU, 2002; WHITNEY et al., 2000) e a pneumonia (KEYNAN; RUBSTEIN, 2007).

Provado que lesões perirradiculares não são estéreis e que podem estar contaminadas por micro-organismos oportunistas associados, devido à comunicação com o meio bucal ou um grupo restrito de anaeróbios facultativos, Abou-Rass e Bogen (1998), se propuseram a identificar quais os micro-organismos associados com lesões perirradiculares sem patência, associadas com terapia endodôntica sem sucesso, e com calcificação pulpar. Em todos os 13 casos examinados, as amostras retiradas do ápice abrigavam micro-organismos sendo 63,6% anaeróbios estritos e 36,4% facultativos. Os resultados indicaram que as lesões perirradiculares sem patência, associadas a canais radiculares calcificados, ou a insucessos no tratamento endodôntico abrigam micro-organismos. A inabilidade em erradicar todos os micro-organismos do canal radicular durante o tratamento do sistema de canais radiculares, pode permitir a colonização bacteriana adicional do ápice radicular e dos tecidos perirradiculares, conseqüentemente promovendo o desenvolvimento da lesão perirradicular e evitando o reparo da região.

Molander et al. (1998), avaliaram a microbiota de dentes com tratamento endodôntico, sendo cem deles associados à lesão perirradicular e vinte sem evidência de lesão perirradicular. Todos os casos haviam sofrido tratamento endodôntico há mais de quatro anos, caracterizando casos de insucesso, sem apresentar, no entanto, sintomas clínicos indicativos de periodontite apical aguda. Na maior parte dos casos associados à lesão perirradicular, uma ou duas espécies bacterianas foram encontradas, sendo sua maioria constituída por anaeróbios facultativos, representando 69% do total de espécies. Bactérias do gênero *Enterococcus* tiveram a maior frequência, apresentando crescimento intenso ou muito intenso em 78% das amostras. Nos dentes que não apresentavam lesão, em 11 casos não

houve crescimento bacteriano. Nas nove amostras restantes, houve crescimento de 13 espécies bacterianas.

Bogen e Slots (1999), realizaram um estudo para determinar a frequência de *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *Prevotella nigrescens* em vinte lesões perirradiculares sem patência associadas com processos patológicos endodônticos refratários, sintomáticas e assintomáticas. Anteriormente à cirurgia parendodôntica, foram coletadas amostras de outros três sítios bucais para análise microbiológica. As amostras da região perirradicular foram colhidas com pontas de papel absorvente, durante os procedimentos cirúrgicos parendodônticos utilizando-se um método onde o risco de contaminação por micro-organismos não-endodônticos fosse mínimo. A identificação bacteriana foi realizada utilizando-se o método de detecção de espécies por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR) baseada no gene 16S rRNA, com alto grau de sensibilidade na identificação de espécies bacterianas de difícil detecção pelas técnicas microbiológicas convencionais. Os resultados demonstram a pouca frequência de bastonetes anaeróbios produtores de pigmentos negros nas lesões perirradiculares sem patência.

Gonçalves e Mouton (1999), avaliaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* em canais radiculares com polpas necróticas e presença de lesão perirradicular visível radiograficamente. Foram examinados 11 canais radiculares por meio de quatro técnicas, entre elas o PCR e o slot-blot, ambos baseados na biologia molecular. Através do método de PCR evidenciou-se a espécie em um maior número de canais, 6/11. Pela técnica de slot-blot, 3/11; 5/11 pelo ELISA e 4/11 pela imunofluorescência.

Siqueira et al. (2000), examinaram o conteúdo de 28 canais radiculares utilizando 42 sondas de DNA e *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Vinte e duas das 42 sondas utilizadas foram reativas em pelo menos uma das amostras. O número de espécies bacterianas em cada amostra foi em média 4,7 espécies, variando de 1 a 17. Das 28 amostras, 17 foram positivas para pelo menos uma das sondas de DNA. As espécies prevalentes foram *B. forsythus*, *Haemophilus aphrophilus*, *Corynebacterium matruchoti*, *P. gingivalis* e *Treponema denticola*. Os métodos baseados na biologia molecular podem fornecer conhecimento adicional a respeito da microbiota endodôntica uma vez que permitem a detecção de bactérias que não são facilmente identificadas pelas técnicas convencionais de cultura.

Jung et al. (2001), procuraram identificar espécies de espiroquetas originárias de infecções endodônticas e determinar sua associação com *B. forsythus* e *P. gingivalis* em dentes portadores de lesão perirradicular visível radiograficamente. Para isso, foram coletadas

amostras do conteúdo dos canais radiculares de 79 dentes, e realizada análise por PCR com a amplificação do gene 16 rRNA. Foi realizada também hibridação *dot-blot* com oito sondas de oligonucleotídeos espécie específicas. A espécie mais freqüente detectada foi *P. gingivalis* seguida de *Treponema maltophilum*, *B. forsythus* e *Treponema socranskii*. Foram observadas associações entre *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*.

Siqueira Jr. e Lopes (2001), examinaram a presença de bactérias na superfície radicular apical de dentes não tratados endodonticamente associados a lesões perirradiculares crônicas. Foram extraídos 27 dentes de humanos com extensas lesões de cárie e lesões perirradiculares de variados tamanhos. Após fixação, as lesões foram removidas e os cinco mm finais da porção apical de cada raiz foram seccionados. A presença de bactérias na superfície radicular foi examinada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura. Células bacterianas foram observadas próximas ao forame apical, mas restritas ao canal radicular. Bactérias na superfície extra-radicular foram observadas em um dente dos 27 estudados (4% dos casos).

Rôças et al. (2001), procuraram determinar a existência de associação entre os micro-organismos *B. forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, conhecidos patógenos periodontais. Por meio da biologia molecular foram estudados 50 canais radiculares de dentes sem vitalidade pulpar e com lesão perirradicular. O DNA das amostras foi extraído e examinado por PCR. Em 33 casos foi encontrado pelo menos um dos micro-organismos estudados. *T. denticola*, *P. gingivalis* e *B. forsythus* foram detectados em 44%, 30% e 20% dos casos respectivamente. Os três micro-organismos foram identificados em conjunto em quatro casos.

Lana et al. (2001), avaliaram a microbiota de 31 canais radiculares de pacientes com polpas necrosadas. Em 22 casos a coroa dentária estava fechada, e em nove já havia comunicação da câmara pulpar com a cavidade bucal. Foram realizadas três coletas em cada canal radicular: a primeira logo após a abertura coronária, com o auxílio de um cone de papel absorvente introduzido nos canais; a segunda, após a instrumentação com limas manuais, irrigação com hipoclorito de sódio, e colocação de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio por sete dias; e a terceira coleta foi realizada com um cone de papel absorvente no final da segunda sessão, que permaneceu no interior dos canais por mais sete dias, quando foi, então, realizada a obturação. Anaeróbios obrigatórios e facultativos, aeróbios e fungos foram detectados em 24, 14, cinco e duas amostras clínicas iniciais respectivamente. Na segunda coleta, mesmo após a instrumentação e o uso de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, micro-organismos facultativos foram isolados em dois canais radiculares, e fungos em três. Na terceira coleta, foram isolados micro-organismos de sete canais radiculares, na sua maioria anaeróbios facultativos. Segundo o autor, estes resultados demonstraram o caráter

polimicrobiano das infecções endodônticas, e a dificuldade de eliminação dos micro-organismos mesmo após o tratamento endodôntico.

Já Siqueira Jr. et al. (2001), examinaram a microbiota de 27 casos abscessos perirradiculares agudos de origem endodôntica por meio da técnica de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. A presença de DNA bacteriano nas amostras clínicas foi confirmada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados mostraram que 37 das 49 sondas de DNA testadas foram reativas em uma ou mais amostras. O número de espécies bacterianas nas amostras de exsudato purulento variou de uma a 33 (em média 5,9). Esse estudo microbiológico, segundo os autores, indicou que métodos genéticos moleculares podem prover conhecimento adicional em relação à microbiota de abscessos perirradiculares agudos por detectar espécies que são difíceis, e até impossíveis, de crescer por cultura.

Moraes et al. (2002), compararam à eficácia da técnica de cultura bacteriana, a do PCR dirigido ao gene 16S rDNA e da *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para detecção de *F. nucleatum* em 13 dentes com canais radiculares infectados e presença de lesão perirradicular. Somando os resultados dos três métodos, a espécie *F. nucleatum* estava presente em quatro dos 13 canais radiculares examinados (31%). A técnica de PCR detectou a espécie *F. nucleatum* em 15,4%, e o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* em 10% da amostra. Não foi possível observar diferença significativa na efetividade das técnicas avaliadas. Também pelo método de sequenciamento de rDNA 16S, Munson et al., no mesmo ano, identificou novamente *E. Brachy* em dentes com infecção perirradicular primária.

Peters et al. (2002), avaliaram as bactérias encontradas em infecções endodônticas de dentes portadores de lesões perirradiculares crônicas sem sintomatologia ou sinais clínicos. Amostras do conteúdo de 58 canais radiculares foram cultivadas em anaerobiose, e os micro-organismos contados e classificados. Todas as amostras apresentaram crescimento bacteriano. Micro-organismos anaeróbios obrigatórios representaram 87% de toda a amostra. A espécie bacteriana mais prevalente foi *P. intermedia*, presente em 33% dos canais radiculares analisados, *P. micros*, em 29% dos canais, e *Actinomyces odontolyticus*, em 19%. De acordo com os resultados observados, os autores concluíram que os patógenos responsáveis por processos patológicos endodônticos não infectam os canais radiculares de forma randômica, mas são encontrados em combinações específicas.

Siqueira Jr. et al. (2002), avaliaram a prevalência de espécies *Actinomyces*, estreptococos e *Enterococcus faecalis* em infecções primárias de canais radiculares pelo uso de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Amostras foram obtidas de 53 dentes infectados, sendo que 27 apresentavam abscesso perirradicular na fase aguda. Tal método permitiu a

detecção de estreptococos em 22,6% das amostras, espécies *Actinomyces* em 9,4% e *E. faecalis* em 7,5%. As espécies mais prevalentes eram membros do grupo *Streptococcus anginosus*. *S. constellatus* foi a única espécie positivamente associada com abscesso perirradicular agudo.

Jacinto et al. (2003), estudaram a correlação entre a composição da microbiota de canais radiculares infectados de dentes com periodontite apical com a presença de sinais e sintomas clínicos. Testaram, ainda, a susceptibilidade a antibióticos de cinco bactérias anaeróbias mais comumente encontradas em canais radiculares de dentes sintomáticos. Amostras bacterianas foram coletadas de 48 canais radiculares, 29 sintomáticos e 19 assintomáticos. Os dentes sintomáticos apresentaram um maior número de anaeróbios estritos nos canais radiculares e um maior número de espécies bacterianas. Mais de 70% das bactérias isoladas foram anaeróbios obrigatórios. Relações foram estabelecidas entre alguns micro-organismos específicos (anaeróbios Gram-negativos) e a presença de dor espontânea e de dor à percussão e à palpação. A maioria das espécies bacterianas anaeróbias testadas foi susceptível a todos os antibióticos estudados, sendo que a espécie que se apresentou menos susceptível foi *P. intermedia/nigrescens* contra a Penicilina G.

Buscando identificar os micro-organismos associados a canais radiculares com abscessos perirradiculares, Sousa et al. (2003), coletaram amostras de trinta canais radiculares, utilizando pontas de papel absorvente esterilizadas. Do total de 117 tipos diferentes de bactérias encontradas, 75 eram anaeróbios estritos. Os anaeróbios estritos mais freqüentemente isolados foram: *P. prevotti*, *P. micros* e *F. necrophorum*. Bactérias facultativas como *Gemella morbillorum* e *Streptococcus mitis* foram também encontradas, porém, em menor quantidade. Concluíram que bactérias anaeróbias Gram-positivas predominam na microbiota mista de canais radiculares com abscesso perirradicular.

A prevalência de *T. socranskii* em infecções endodônticas foi estudada por Siqueira Jr. e Rôças (2003), por meio do *nestedPCR*. As amostras foram coletadas de sessenta canais radiculares com necrose pulpar e diferentes processos patológicos perirradiculares. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado por meio de *primers* universais 16S rDNA. Uma segunda amplificação, desta vez com os produtos do PCR, foi realizada para detectar um fragmento específico do *T. socranskii* 16S rDNA. *T. socranskii* foi detectado em 11 dos 28 casos assintomáticos (39,3%), cinco dos 12 canais radiculares associados com periodontite apical aguda (41,7%), e cinco dos vinte casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo (25%). Não foi possível observar relação entre a presença de *T. socranskii* e a ocorrência de sintomatologia. Em geral, este micro-organismo foi detectado em 21 das

sessenta amostras (35%).

Rôças et al. (2003), avaliaram a presença de espécies de *Treponema* em infecções endodônticas primárias usando o *nestedPCR*. As amostras foram coletadas de 32 canais radiculares. Vinte e dois casos apresentavam lesões perirradiculares crônicas assintomáticas, e dez casos sintomáticos foram diagnosticados como periodontite apical aguda. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado usando *primers* universais 16S rDNA. Uma segunda amplificação usou os produtos PCR para detectar um fragmento específico do 16S rDNA de cada uma das espécies de *Treponema* investigadas (*T. denticola*, *T. socranskii*, *T. vincentii* e *T. pectinovorum*). Em todas as amostras foram detectadas bactérias. *T. denticola* foi detectada em 77,3% dos casos assintomáticos, *T. socranskii* em 40,9%, *T. vincentii* em 18,2% e *T. pectinovorum* em 13,6%. Nos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, *T. denticola* foi detectado em 80% dos canais radiculares, enquanto *T. socranskii* e *T. vincentii* foram detectados em 40% e em 10% dos casos, respectivamente. *T. pectinovorum* não foi observado nos casos sintomáticos. Em geral, o *nested PCR* demonstrou a presença de *T. denticola* em 78,1% dos casos, *T. socranskii* em 40,6%, *T. vincentii* em 15,6% e *T. pectinovorum* em 9,4%. Pelo menos uma das quatro espécies de *Treponema* foi encontrada em 84,4% dos casos examinados. Com base nos dados acima e, pela reconhecida patogenicidade destes micro-organismos, eles devem ser reconhecidos como supostos patógenos endodônticos.

Siqueira Jr. et al. (2003), realizaram um estudo a fim de detectar, por meio do método de PCR, a espécie *P. micros* em infecções endodônticas primárias. As amostras foram colhidas de 50 casos de lesões perirradiculares crônicas assintomáticas, periodontite apical aguda e abscesso perirradicular agudo. O DNA extraído das amostras foi amplificado utilizando o ensaio PCR, reproduzindo um fragmento do *P. micros* 16S rDNA. Esta espécie foi detectada em seis dos 22 canais radiculares associados a lesões perirradiculares assintomáticas (27,3%), em dois dos oito canais radiculares com periodontite apical aguda (25%), e em seis dos vinte casos de abscesso perirradicular agudo (30%). Considerando o total da amostra, *P. micros* foi encontrado em 14 casos (28%). Não houve, portanto, correlação entre a presença de *P. micros* e a ocorrência de sintomatologia. Os achados sugerem que *P. micros* pode estar envolvido na patogênese de diferentes formas de lesões perirradiculares.

Siqueira Jr. e Rôças (2003), estudaram a ocorrência de *Campylobacter gracillis* e *Campylobacter rectus* em infecções endodônticas primárias pelo método de PCR. As amostras foram coletadas de 57 canais radiculares com necrose pulpar e evidência de reação



perirradicular. Foram incluídos na amostra: 28 casos de lesão perirradicular crônica, 12 casos de periodontite apical aguda e 17 casos de abscesso perirradicular agudo. O DNA foi extraído das amostras e inicialmente amplificado usando um *primer* universal 16S rDNA. Uma segunda amplificação foi realizada com os produtos do PCR para detectar especificamente o *C. gracilis* ou *C. rectus* nas amostras. Estas duas espécies foram encontradas em 21,4% (6 de 28) e 30% (6 de 20) dos canais radiculares associados a lesões perirradiculares assintomáticas, respectivamente. *C. gracilis* foi encontrado em 16,7% (2 de 12) dos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, enquanto *C. rectus* em 33,3% (2 de seis casos). Nos abscessos perirradiculares agudos, *C. gracilis* e *C. rectus* foram detectados em 23,5% (4 de 17) e 11,8% (2 de 17) dos casos, respectivamente. Considerando toda a amostra, *C. gracilis* foi observada em 21,1% e *C. rectus* em 23,3% das amostras dos canais radiculares. Estes achados confirmam a participação das espécies *C. gracilis* e *C. rectus* nas infecções endodônticas primárias.

Siqueira Jr. e Rôças (2003), utilizaram o método de PCR para avaliar a ocorrência da espécie *Pseudoramibacter alactolyticus* em canais radiculares infectados associados a lesões perirradiculares assintomáticas ou pericementite apical e em amostras de secreção purulenta coletadas de abscessos perirradiculares agudos. O DNA foi extraído das amostras e inicialmente amplificado utilizando-se *primers* universais. Uma segunda amplificação foi realizada usando os produtos do PCR, a fim de detectar um fragmento específico de *P. alactolyticus* 16S rDNA. Foi possível encontrar a espécie *P. alactolyticus* em 76% das amostras dos canais radiculares associados a lesões perirradiculares crônicas, em 60% das amostras dos canais radiculares associados à pericementite apical aguda, e em 32% das amostras de secreção aspiradas dos abscessos perirradiculares agudos. Não foi determinada associação significativa da espécie aos sintomas clínicos. Em geral, *P. alactolyticus* foi observada em 56% das amostras.

Siqueira Jr. e Rôças (2003), estudaram a prevalência de *B. forsythus* em infecções endodônticas primárias usando o *Nested PCR*. As amostras foram colhidas de 50 canais radiculares com diferentes formas de reação perirradicular. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado usando um *primer* universal. Em seguida, foi realizada uma segunda amplificação, usando os produtos do PCR para identificar um fragmento específico do 16S rDNA de *B. forsythus*. Foi possível identificar *B. forsythus* em 13 dos 22 casos assintomáticos (59,1%), 4 dos 10 canais associados com periodontite apical aguda (40%), e em 9 dos 18 casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo (50%). Não foi possível observar relação entre a presença de *B. forsythus* e a ocorrência de sintomatologia. Esta espécie foi

detectada em 26 das 50 amostras colhidas dos canais radiculares (52%). Os resultados deste estudo confirmaram a associação do *B. forsythus* com infecções de origem endodôntica, e sugerem que a espécie pode estar envolvida na patogênese das diferentes formas de lesões perirradiculares.

Rôças et al. (2004), estudaram a associação da espécie *E. faecalis* com diferentes formas de doenças perirradiculares. De acordo com os autores, esta espécie seria ocasionalmente isolada de casos de infecção endodôntica primária, mas seria freqüentemente encontrada em falhas de tratamento endodôntico. As amostras foram coletadas de canais radiculares não tratados endodonticamente, associados com lesões perirradiculares crônicas assintomáticas, pericementite apical aguda ou abscesso perirradicular agudo; e de canais radiculares já tratados endodonticamente, associados a lesões perirradiculares crônicas assintomáticas. Foi extraído o DNA das amostras, e para identificação da espécie *E. faecalis*, foi utilizada a técnica de *Nested PCR*. Foi possível a detecção de *E. faecalis* em 7 dos 21 canais radiculares associados com lesões assintomáticas, em 1 dos 10 canais radiculares associados com pericementite apical aguda, e em 1 dos 19 casos de abscesso perirradicular agudo. A análise estatística demonstrou que a espécie *E. faecalis* está significativamente mais associada com casos assintomáticos do que com as infecções com características agudas. *E. faecalis* foi detectada em 20 dos 30 casos de infecção persistente pós-tratamento endodôntico. Quando comparadas as freqüências desta espécie nos casos de infecção persistente e nos casos de infecção endodôntica primária, a análise estatística demonstrou uma forte associação do *E. faecalis* com as infecções persistentes.

Socransky et al. (2004), por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, estudaram complexos ecossistemas microbianos. Avaliaram 8887 amostras de placa subgingival de 79 pacientes periodontalmente saudáveis e de 272 pacientes com periodontite crônica; e 8126 amostras de 166 pacientes antes e após tratamento periodontal. Reduções significativas foram observadas após terapia periodontal. As sondas de DNA utilizadas provaram ser uma ferramenta útil para enumerar espécies bacterianas em complexos ecossistemas microbiológicos.

Siqueira Jr. et al. (2005), compararam a prevalência de sete patógenos endodônticos em amostras de infecções endodônticas primárias coletadas de pacientes de duas distintas localizações geográficas. Os achados mostraram que a prevalência de algumas espécies em infecções de origem endodôntica pode ser significativamente diferente de uma região para outra.

Ferrari et al. (2005), estudou o efeito de procedimentos endodônticos sobre enterococos

e fungos em infecções endodônticas primárias. Vinte e cinco dentes unirradiculares com polpas necróticas, intactas e lesões perirradiculares foram selecionados. Amostras foram coletadas dos canais antes e após a instrumentação. Micro-organismos isolados foram identificados por testes bioquímicos. Enterococos e fungos estavam presentes em infecções endodônticas primárias. Particularmente, *E. faecalis* e *Enterococcus faecium* foram resistentes ao preparo do canal radicular complementado pelo curativo de demora.

Foschi et al. (2005), estudaram a presença de certas bactérias como *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *T. denticola*, em canais radiculares infectados utilizando o método de PCR, e a associação dessas bactérias com sinais clínicos de doenças endodônticas. Amostras microbiológicas foram obtidas de 62 dentes em 54 pacientes com problemas endodônticos. Os dentes foram categorizados de acordo com o diagnóstico: periodontite apical aguda, periodontite apical crônica ou periodontite apical exacerbada. Setenta e um por cento dos casos eram infecções endodônticas primárias e 29% eram recorrentes (secundárias), ou seja, casos de insucesso endodôntico. *T. denticola* e *E. faecalis* foram encontrados em 15 das 62 amostras (24%), *P. gingivalis* em 8 amostras (13%), *P. intermedia* em 5 amostras (8%), e *T. forsythensis* em 4 amostras (7%). *T. denticola* foi detectado em 56% de dentes com periodontite apical exacerbada. *E. faecalis* foi encontrado em 60% de dentes com periodontite apical crônica e em 72% de dentes com infecção secundária. Análises estatísticas demonstraram uma associação de periodontite apical crônica e infecção endodôntica secundária com a presença de *E. faecalis*. Periodontite apical exacerbada foi associada com a presença de *T. denticola*. Portanto, *T. denticola* foi associado a infecções endodônticas sintomáticas e à presença de reabsorção óssea apical e *E. faecalis* foi associado a insucessos endodônticos.

Siqueira Jr. e Rôças (2005), discutiram a aplicação de métodos moleculares em pesquisas de microbiologia endodôntica para uma caracterização mais completa da microbiota associada com diferentes tipos de infecções endodônticas. Os autores afirmaram que a introdução na pesquisa endodôntica dos métodos moleculares têm contribuído significativamente para o entendimento dessas infecções na Endodontia. Os métodos moleculares tem revelado uma maior complexidade da microbiota endodôntica, comparativamente à técnica de cultura microbiológica. Além disso, por detectar algumas espécies cultiváveis de baixa prevalência, os métodos moleculares têm também expandido a lista de patógenos endodônticos pela inclusão de algumas espécies bacterianas fastidiosas ou, até mesmo, não cultiváveis, que até então não tinham sido encontradas nas infecções endodônticas.

Jacinto et al. (2006), estudaram a prevalência de *P. gingivalis* em canais radiculares de dentes com abscesso perirradicular e avaliaram a susceptibilidade dessa espécie a alguns antibióticos prescritos frequentemente. Amostras foram obtidas de 70 canais radiculares de dentes com abscesso. A obtenção das amostras bem como os procedimentos laboratoriais foram realizados por métodos de cultura microbiológica apropriados para espécies anaeróbias. Os antibióticos testados foram: amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulanato, azitromicina, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina. Um total de 352 tipos de micro-organismos foi encontrado, pertencente a 69 espécies diferentes. Oitenta e três por cento dos microrganismos eram anaeróbios estritos e 47,5% das bactérias isoladas eram Gram-negativas. *P. gingivalis* foi encontrado em vinte canais radiculares e mais frequentemente em casos sintomáticos. Todos dessa espécie foram sensíveis a: amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulanato, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, metronidazol e tetraciclina. Um tipo foi resistente a eritromicina e oito foram resistentes a azitromicina. Os autores concluíram que o patógeno *P. gingivalis* é isolado com frequência de canais radiculares de dentes com abscessos perirradiculares. Amoxicilina, assim como amoxicilina associada ao ácido clavulânico e benzilpenicilina foram efetivas contra *P. gingivalis*.

Sakamoto et al. (2006), estudaram a diversidade na composição da microbiota relacionada com infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas. Amostras foram coletadas de infecções endodônticas assintomáticas associadas a lesões perirradiculares crônicas e de infecções clinicamente sintomáticas diagnosticadas como abscessos agudos. Os resultados revelaram que as seguintes espécies foram as mais comumente encontradas: *F. nucleatum*, *P. micros/Peptostreptococcus sp.*, *Prevotella sp.*, *Lachnospiraceae* “oral clone 55A-34”, *Filifactor alocis*, *Megasphaera sp.* e *Veillonella sp.* *Bacteroides sp.* e *Dialister sp.* foram detectadas somente em dentes assintomáticos. A análise molecular da microbiota associada a infecções endodônticas sintomáticas ou assintomáticas indicou que a diversidade da microbiota endodôntica é maior do que a anteriormente descrita por métodos de cultura, anos depois Zhang et al. (2012), encontrou proporções parecidas quando comparados os filos.

Sedgley et al. (2006), examinaram a presença de *E. faecalis* em amostras de vários sítios da cavidade bucal de pacientes com necessidade de tratamento endodôntico. Amostras foram coletadas de quatro diferentes sítios: cavidade bucal, língua, sulco gengival, canal radicular. Foi analisada a presença de *E. faecalis* pelo método de PCR e por cultura microbiológica. Os autores avaliaram se a prevalência de *E. faecalis* na cavidade bucal é dependente do sítio da amostra e se o método de PCR é mais sensível que a cultura microbiológica na detecção de *E.*

*faecalis*. Possíveis associações entre características clínicas dos pacientes e a presença de *E. faecalis* também foram checadas. Um total de 136 amostras foi coletado de 41 pacientes. Amostras provenientes da língua e da cavidade bucal (bochecha) foram coletadas de todos os pacientes; de 31 desses pacientes foram também obtidas amostras do sulco gengival e, de 23 deles, amostras do canal radicular. *E. faecalis* foi detectado em 68% dos pacientes em pelo menos um dos seguintes sítios: cavidade bucal, língua, sulco gengival. No canal radicular, *E. faecalis* aparecem somente em 5% dos pacientes. O método de PCR foi mais sensível do que a cultura microbiológica em detectar *E. faecalis* em amostras da cavidade bucal (32% e 4%, respectivamente).

Seol et al. (2006), propuseram detectar a presença de *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. tanneriae* em amostras clínicas utilizando o método de reações em cadeia da polimerase (PCR). Dois diferentes protocolos de PCR foram utilizados (um para as duas espécies de *Porphyromonas* e outro para as três espécies de *Prevotella*). Os resultados foram comparados àqueles obtidos pelos métodos tradicionais de cultura microbiológica. Amostras microbianas foram coletadas assepticamente de quarenta canais radiculares infectados de pacientes com abscesso. Condições de anaerobiose foram obtidas para a técnica de cultura utilizando um kit “Rapid ID 32”. O método de PCR foi processado por meio do DNA extraído de cada amostra. Pelo menos uma das cinco espécies de bactérias pigmentadas de negro foi encontrada em 65% (26 de 40) das amostras utilizando PCR, e em 15% (6 de 40) utilizando o tradicional método de cultura. O PCR foi mais rápido, sensível, específico e efetivo em detectar bactérias pigmentadas de negro do que os procedimentos convencionais de cultura.

Brito et al. (2007), através das técnicas de Multiple-Displacement Amplification e *Checkerboard DNA-DNA hybridization* amplificaram uniformemente genomas bacterianos presentes em pequenas amostras e as analisou com objetivo de examinar a microbiota de infecções endodônticas. Sessenta e seis amostras foram coletadas a partir de dentes com infecções endodônticas. Todas as sondas hibridizaram com pelo menos uma amostra após a amplificação. As espécies mais comumente detectadas em ambas as amostras amplificadas e não amplificadas foram *Prevotella tanneriae* e *Acinetobacter baumannii* em frequências entre 89 e 100% das amostras. A microbiota endodôntica era muito mais complexa do que o mostrado anteriormente, embora perfis microbianos em dentes com ou sem lesões perirradiculares não diferiram significativamente.

Figdor e Sundqvist (2007), mostraram que as infecções endodônticas primárias são geralmente compostas por uma mistura polimicrobiana com proporções aproximadamente iguais de espécies Gram-positivas e Gram-negativas, dominados por anaeróbios estritos.

Sassone et al. (2007), encontraram as seguintes espécies mais prevalentes através do método *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. *E. faecalis*, *C. gracilis*, *Leptotrichia buccalis*, *Neisseria mucosa*, *P. melaninogenica*, *F. nucleatum ssp. vincentii*, *E. saburreum*, *S. anginosus*, e *V. Parvula*, com uma média de 22 espécies por amostra, corroborando com o perfil misto da infecção perirradicular.

Em outro momento Sassone et al. (2008), avaliou a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias associados com dentes sintomáticos. A presença de 40 espécies bacterianas foi determinada pelo método de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. As espécies encontradas no maior número dos casos sintomáticos foram *F. nucleatum ssp. vincentii*, *V. parvula*, *T. socranskii*, *E. faecalis*, e *C. gracilis* e em casos assintomáticas foram *F. nucleatum ssp. vincentii*, *Fuso-bactéria nucleatum ssp. nucleatum*, *E. faecalis*, *E. saburreum*, e *N. mucosa*. A contagem bacteriana total e a contagem de *T. forsythia* foram significativamente maiores nos casos sintomáticos, enquanto os níveis de *P. acnes* foram reduzidos neste mesmo grupamento. Os dados desse estudo sugerem uma associação entre o aumento da contagem de bactérias totais e a da espécie *T. forsythia* a presença de dor. *F. nucleatum* foi também detectada em alta prevalência nos estudos de Chugal et al. (2011).

Rôças e Siqueira Jr. (2009), relataram a prevalência de três novos candidatos a patógenos orais: *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisacchari-Vorax*, e *Bacteroidetes X083 clone oral* em infecções endodônticas primárias. O DNA genômico foi isolado a partir de amostras coletadas a partir de 52 dentes com diferentes formas de periodontite apical. *e B. X083 clone oral*, *P. baroniae* e *P. multisaccharivorax* foram detectadas respectivamente em 81%, 43% e 38% dos canais radiculares de dentes associados com periodontite apical crônica, em 60%, 40% e 40% do canais de dentes com periodontite apical aguda, e em 14%, 24% e 5% dos aspirados de abscessos apicais agudos. Em geral, *B. X083 clone oral*, *P. baroniae*, e *P. multisaccharivorax* foram encontrados em 50%, 35%, e 25% das amostras tomadas a partir de infecções endodontia primárias, respectivamente.

Rôças e Siqueira Jr. (2010), coletaram amostras de canais infectados de 15 dentes com periodontite apical antes do tratamento (S1), após o preparo químico-mecânico com NaOCl como irrigante (S2), e após a medicação entre as sessões com uma pasta de hidróxido de cálcio (S3). As bactérias foram encontradas em todas as amostras S1, sendo as mais prevalente em S1 *Olsenella uli* (67%), *Pyramidobacter piscolens* (60%), espécies de

*Streptococcus* (53%), e *B. clone X083* (53%).

Sassone et al. (2012), avaliaram por meio de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias em casos associados à exposição (n = 30) e não expostos (n = 30) do espaço pulpar à cavidade bucal. As espécies encontradas em maior número, em casos de espaço pulpar expostos foram *E. saburreum*, *F. nucleatum ssp. vincentii*, *T. forsythia*, *E. faecalis*, *N. mucosa*, *C. gracilis* e *P. nigrescens* e, em casos de espaço de pulpar não exposto foram *F. nucleatum ssp. vincentii*, *N. mucosa*, *E. faecalis*, *E. saburreum*, *C. gracilis*, e *P. gingivalis*.

Shang (2013) coletou amostras de 11 dentes decíduos com lesões periapicais em provenientes de infecções endodônticas primárias. O DNA foi extraído a partir de cada amostra e analisado usando clonagem e sequenciamento do rRNA 16S para a identificação de bactérias. *F. nucleatum* (8/11), *D. Invisus* (8/11), *C. gracilis* (7/11), *E. coli DH1* (6/11), *A. segnis* (6/11), e *S. mitis* (6/11) foram as espécies mais prevalentes.

Já Murad (2013), por meio do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, detectou em amostras de infecções endodônticas persistentes *P. melaninogenica* e *P. nigrescens* em 22% dos casos, seguidas por *P. intermedia* (19%) e *P. oris* (17%), sendo que a *P. melaninogenica* apresentou os níveis médios mais altos, *H. pylori* foi detectado em 11% dos casos, porém quando presente foi observado em alta contagem bacteriana.

## 2 OBJETIVOS E METAS

### Objetivo Geral:

Este estudo pretende detectar o perfil microbiano presente em infecções endodônticas primárias em dentes com lesão perirradicular associada, correlacionando a microbiota encontrada com o tamanho/volume destas lesões.

### Objetivos Específicos:

- a) determinar a diversidade da microbiota encontrada em dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular associada;
- b) correlacionar tanto o tamanho quanto o volume da lesão perirradicular associada à microbiota encontrada.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção da Amostra e Desenho Experimental**

As amostras foram coletadas de canais radiculares de pacientes que foram encaminhados para tratamento endodôntico ao sistema de atendimento a saúde da Odontoclínica Central da Aeronáutica. A participação na pesquisa foi voluntária e os mesmos assinaram um termo de consentimento de participação elaborado segundo a Resolução 196/96 do Ministério da Saúde (Conselho Nacional da Saúde, 1996) (APÊNDICE A). O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ (Nº do parecer 102.647 – ANEXO).

Foram selecionados 19 pacientes com idades entre 21 e 68 anos que tinham elementos dentários com infecção endodôntica primária e evidência radiográfica de lesão perirradicular apical radiolúcida associada, sem nenhuma resposta ao teste de sensibilidade térmico e que possuísem coroa adequada para o isolamento absoluto durante o acesso. Além disso, os elementos não poderiam apresentar comprometimento periodontal (perda de inserção maior que 4 mm).

Foram excluídos da amostra pacientes que fizeram uso de antibióticos, corticoesteróides ou antiinflamatórios sistêmicos nos últimos seis meses ou com condições sistêmicas que necessitassem de cobertura antibiótica para que o tratamento endodôntico pudesse ser realizado.

Os pacientes inicialmente responderam a um questionário informando sobre seu estado de saúde geral (Apêndice B). Após a concordância do paciente em participar da pesquisa, foi realizada a consulta de avaliação deste estudo que seguiu a seguinte dinâmica: preenchimento e verificação da anamnese, exame clínico, exame radiográfico, exame tomográfico e avaliação microbiológica (Apêndice C, D e E).

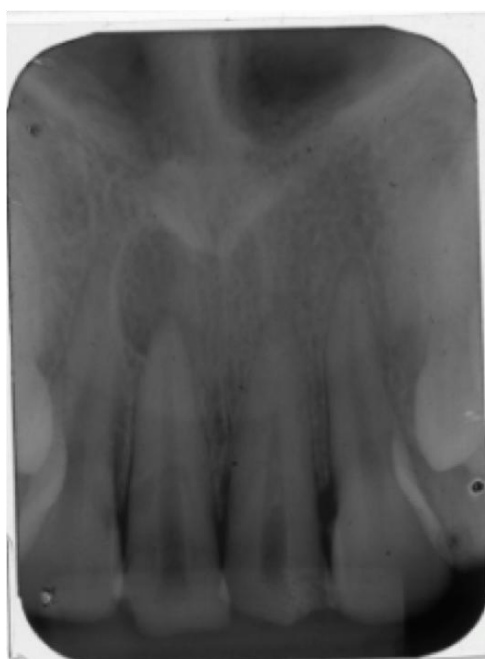
#### **3.2 Exame Clínico e Radiográfico**

Durante o exame clínico foram coletados dados subjetivos e objetivos (Apêndice B) de cada elemento incluído nesse trabalho como a seguir: presença ou ausência de fístula ou de dor, e se havia comunicação entre a cavidade pulpar e o meio oral, ou seja, se a câmara coronária estava ou não aberta clinicamente à cavidade oral.

Foram realizadas radiografias periapicais de todos os dentes com filme *Extra-speed* (Kodak, Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) utilizando a técnica do paralelismo com auxílio de posicionadores radiográficos.

As radiografias periapicais iniciais foram digitalizadas com o auxílio de um *scanner* (*Colorpage-vivid 3xe*® (*Genius*®, KYE Systems Corporation, EUA) e suas lesões perirradiculares tiveram sua área medida por meio de programa de computador *ImageTool* 1.4.1 (UTHSCSA, San Antonio, Texas, EUA).

Figura 1 – Radiografia periapical de uma amostra do estudo



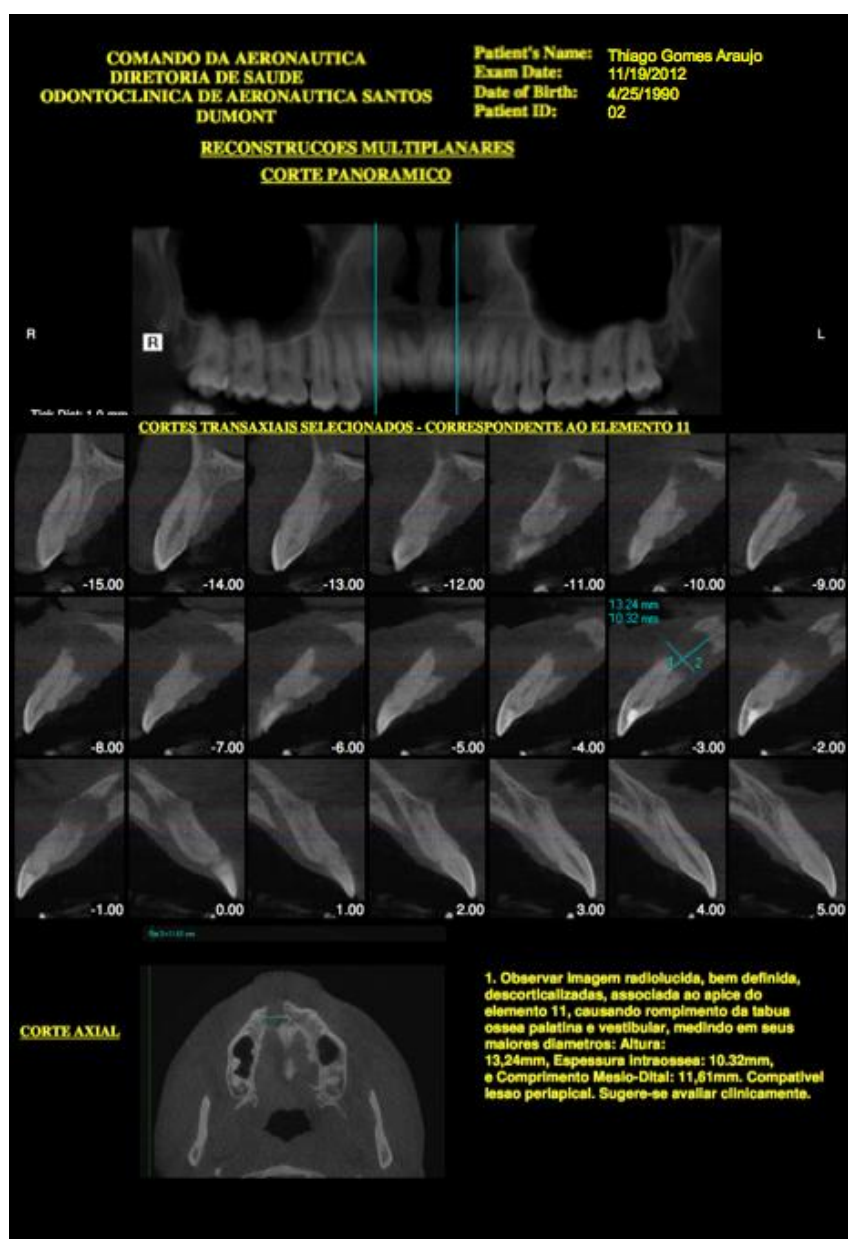
Fonte: O autor, 2013

### 3.3 Exame Tomográfico

Após o paciente ter passado pelo preenchimento e verificação da anamnese, exame clínico e exame radiográfico, este era encaminhado ao setor de tomografia computadorizada, a fim de realizar uma tomografia Cone-beam, da região a ser avaliada, com o intuito de mensurar o volume da lesão perirradicular apresentada pelo paciente. Realizado o exame, o paciente era novamente encaminhado ao setor de atendimento para realização da coleta microbiológica e o posterior tratamento endodôntico. O aparelho utilizado foi o Tomógrafo Cone Beam Gendex CB 500 (GENDEX KAVO, Biberach, Alemanha) na Odontoclínica de Aeronáutica Santos-Dumont (OASD) com exposição de 25 voxel/23seg e tamanho de volume reconstruído de 14 cm.

O volume de cada lesão foi avaliado por meio dessas tomadas tomográficas e calculado por meio de integrais da seguinte forma, pra cada uma das lesões foi aferida os dois maiores diâmetros  $f(x)$  e  $g(x)$  sendo que, para determinar a lesão de forma regular, seguimos os parâmetros descritos para cálculo de volumes de sólidos irregulares (FOULIS, et al., 1982; KRANTZ e GEORGE, 2002).

Figura 2 – Tomografia Cone Beam de uma amostra do estudo



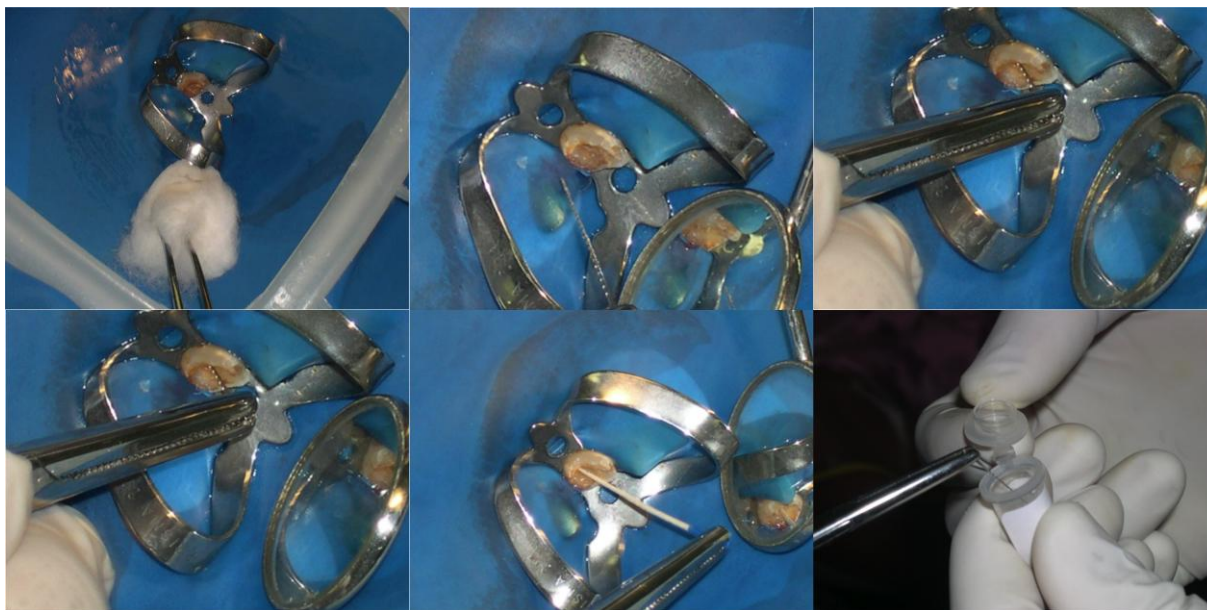
Fonte: O autor, 2013

### 3.4 Avaliação microbiológica

#### 3.1.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas sob rígido controle asséptico, conforme descrito previamente por Sassone et al. (2007). Inicialmente foi feita profilaxia do elemento com pedra-pomes e em seguida o isolamento absoluto do mesmo foi realizado. O elemento e o campo operatório ao seu redor foram limpos com peróxido de hidrogênio a 3 % e descontaminados com a aplicação de solução de hipoclorito de sódio 5,25%. A cirurgia de acesso foi realizada com o uso de brocas esféricas compatíveis com o tamanho da coroa dentária e brocas Endo Z (Dentsply/ Maillefer, Ballagueires, Suíça) estéreis sem *spray* de água. O campo operatório, incluído a câmara coronária, foi novamente descontaminado com hipoclorito de sódio 5,25% e esta solução foi neutralizada com solução estéril de tiosulfato de sódio 5%. No caso do canal radicular encontrar-se seco, uma pequena quantidade de solução salina estéril era introduzida no mesmo. As amostras foram inicialmente coletadas com o auxílio de limas Hedströen #15 (Dentsply/ Maillefer) com o cabo cortado, presa a uma pinça hemostática estéril. A lima era introduzida até 1mm aquém do forame apical e era realizado um leve movimento de limagem. Feito isso, duas pontas de papel absorventes estéreis foram levadas ao interior do canal em sequência até o mesmo ponto que a lima anteriormente utilizada, com o objetivo de absorver o fluído presente no meio. Cada ponta de papel era mantida na mesma posição por um minuto. O material coletado, na lima cortada e nas duas pontas de papel absorvente utilizadas, foi transferido para tubos de *Eppendorf* contendo solução tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM E.D.T.A., ph 7,6). A cada tubo *Eppendorf* contendo a amostra obtida era adicionado 100ul de 0,5M NaOH e esta era então congelada a - 20°C até o momento do processamento.

Figura 3 – Etapas da coleta



Fonte: SASSONE, 2005

### 3.1.2– Determinação dos micro-organismos orais utilizando a técnica de Checkerboard DNA-DNA hybridization

#### *Colocação das amostras na membrana de nylon*

As suspensões contendo as amostras coletas foram fervidas em banho-maria por dez minutos e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8ml de 5M de acetato de amônia. Com isso, as células bacterianas eram lisadas e o DNA ficava suspenso na solução. Cada suspensão de amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do *Minislot 30*<sup>®</sup> (Immuntetics, Cambridge, MA, EUA) e o DNA concentrado em uma membrana de *nylon* (15x15cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL, EUA). A membrana, fixada na mesma por intermédio de aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos. As duas últimas canaletas do *Minislot 30*<sup>®</sup> foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de micro-organismos que foram investigadas pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células bacterianas.

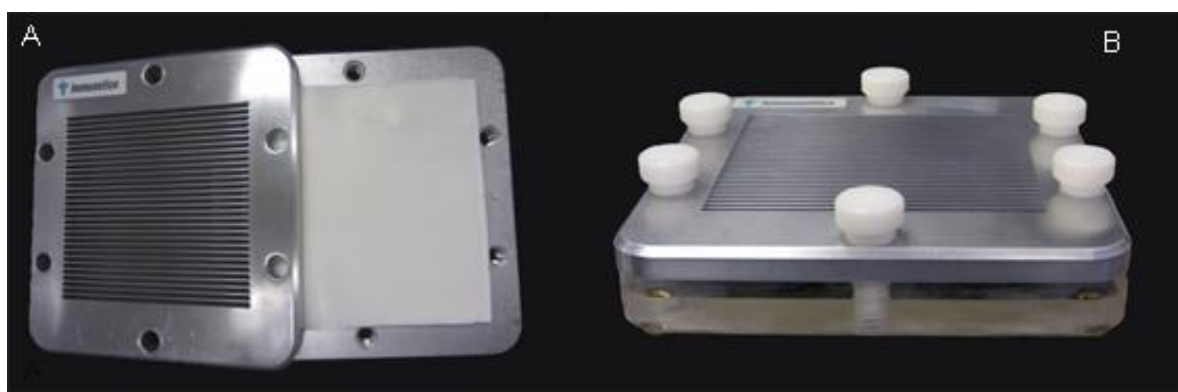
#### *Hibridização das membranas com as sondas de DNA*

Após fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1h numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC, 25mM de fosfato de sódio (pH 6,5)

e 0,5 mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do *Miniblotter 45*<sup>®</sup> (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas mantendo o DNA fixado perpendicularmente às canaletas do *Miniblotter 45*<sup>®</sup>. O *Miniblotter 45*<sup>®</sup> contém 45 canaletas que servem cada uma para a colocação de uma sonda de DNA.

As sondas de DNA foram confeccionadas usando o *random primer digoxigenin labeling Kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, EUA), como descrito por Feinberg e Vogelstein em 1983. Sondagens de DNA específicas para setenta e nove espécies foram usadas nesse estudo (Tabela 1). Estas espécies foram escolhidas por sua associação a infecções endodônticas primárias (PANTERA, et al., 1988; SASSONE et al., 2007; RÔÇAS e SIQUEIRA JR., 2009; SIQUEIRA JR., et al., 2000), secundárias (RÔÇAS e SIQUEIRA JR., 2010; RÔÇAS e SIQUEIRA JR., 2012) e periodontais (FAVERI et al., 2009; SOCRANSKY et al., 1994; SOCRANSKY et al., 1998; TELES et al. 2007). Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de  $10^4$  células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas fosse semelhante. Cada canaleta do *Miniblotter 45*<sup>®</sup> foi preenchida com 135µl de uma determinada sonda, contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20mM de fósforo de sódio (pH 6,5), 0,2mg/ml de RNA de levedura, 10 % de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20mg/ml de sonda de DNA). As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais. O aparato, contendo as membranas, foi colocado dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu a 42°C, durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

Figura 4 - Fotografia da montagem do *Minislot 30*<sup>®</sup> com a colocação da membrana de *nylon*.



Legenda: *Minislot 30*<sup>®</sup> aberto, com a membrana de nylon posicionada (A). *Minislot 30*<sup>®</sup> fechado (B).

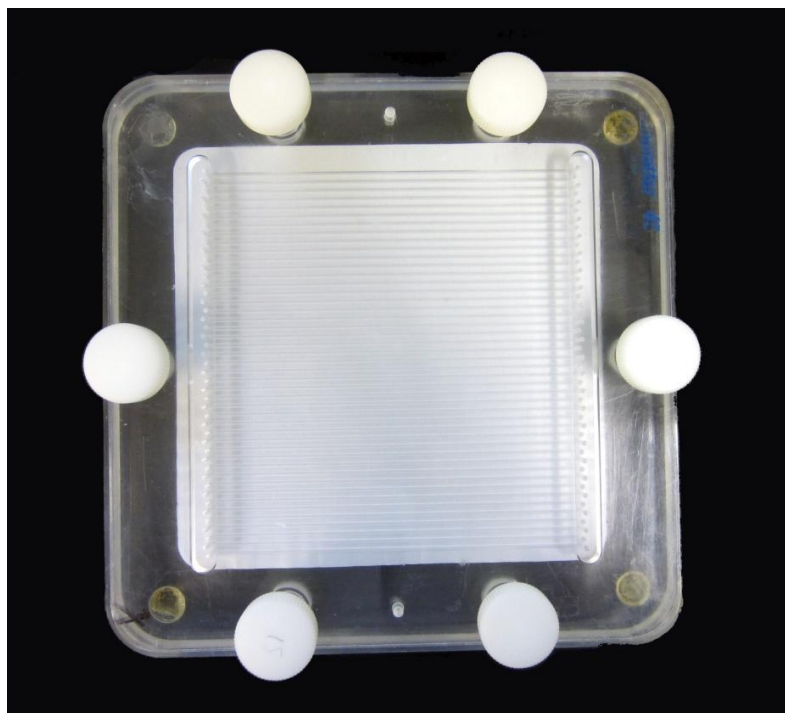
Fonte: MURAD, 2013

Figura 5 - Fotografia da colocação das amostras de infecções endodônticas nas canaletas do *Minislot 30*<sup>®</sup>, sobre a membrana de *nylon*.



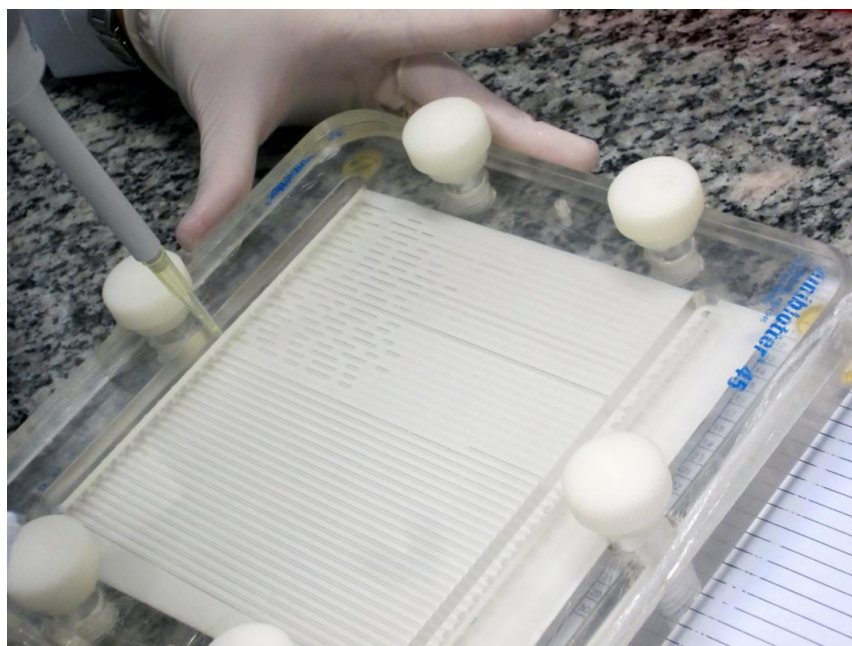
Fonte: MURAD, 2013

Figura 6 - Fotografia do *Miniblotter 45*<sup>®</sup>



Fonte: MURAD, 2013

Figura 7 - Fotografia da colocação das sondas de DNA perpendicularmente as amostras já previamente fixadas, na membrana de *nylon*, no *Miniblotter 45*<sup>®</sup>.



Fonte: MURAD, 2013



Tabela 1 – Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano (continua)

Micro-organismo	ATCC	Micro-organismo	ATCC
<i>Actinomyces naeslundii</i> *	12104	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	10031
<i>Actinomyces israelii</i> *	12102	<i>Leptotrichia buccalis</i> *	14201
<i>Actinomyces gerencseriae</i> *	23860	<i>Mobiluncus curtissii</i> *	35241
<i>Actinomyces meyeri</i> *	35568	<i>Nectria haematococca</i> *	48626
<i>Actinomyces odontolyticus</i> *	17929	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	21824
<i>Actinomyces oris</i> *	43146	<i>Neisseria meningitidis</i> *	13077
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	29242	<i>Neisseria mucosa</i> *	19696
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes-a</i> *	43718	<i>Neisseria polysaccharea</i> *	43768
<i>Atopobium rimae</i> *	49626	<i>Neisseria sicca</i> *	29256
<i>Bacteroides fragilis</i> *	25285	<i>Parvimonas micra</i> *	33270
<i>Bacteroides ureolyticus</i> *	33387	<i>Porphyromonas endodontalis</i> *	35406
<i>Campylobacter gracilis</i> *	33236 (1084)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> *	33277
<i>Campylobacter rectus</i> *	33238 (371)	<i>Prevotella intermedia</i> *	25611
<i>Campylobacter showae</i> *	51146	<i>Prevotella melaninogenica</i> *	25845
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> *	33624 (27)	<i>Prevotella nigrescens</i> *	33563
<i>Capnocytophaga ochracea</i> *	33596 (25)	<i>Prevotella oris</i> *	33573
<i>Capnocytophaga sputigena</i> *	33612 (4)	<i>Propionibacterium acnes I</i> *	11827
<i>Corynebacterium matruchotii</i> *	14266	<i>Rothia dentacariosa</i> *	17931
<i>Dialister pneumosintes</i> *	G8427	<i>Selenomonas noxia</i> *	43541
<i>Eikenella corrodens</i> *	23834	<i>Serratia marcescens</i> *	13477
<i>Enterobacter aerogenes</i> *	13048	<i>Spiroplasma ixodetis</i> *	33835
<i>Enterobacter cloacae</i> *	10699	<i>Staphylococcus aureus</i> *	33591
<i>Enterobacter gergoviae</i> *	33028	<i>Staphylococcus epidermidis</i> *	14990
<i>Enterobacter sakazakii</i> *	12868	<i>Staphylococcus warneri</i> *	27836
<i>Enterococcus faecalis</i> *	29212	<i>Streptococcus anginosus</i> *	33397
<i>Enterococcus faecium</i> *	6569	<i>Streptococcus constellatus</i> *	27823 (M32b)
<i>Escherichia coli</i> *	10799	<i>Streptococcus gordonii</i> *	10558
<i>Eubacterium brachy</i> *	33089	<i>Streptococcus intermedius</i> *	27335
<i>Eubacterium limosum</i> *	8486	<i>Streptococcus mitis</i> *	49456
<i>Eubacterium nodatum</i> *	33099	<i>Streptococcus oralis</i> *	35037
<i>Eubacterium saburreum (NEW 1-6-99)</i> *	33271	<i>Streptococcus pneumoniae</i> *	49619
<i>Filifactor alocis</i> *	35896	<i>Streptococcus pyogenes</i> *	12344
<i>Fusobacterium necrophorum</i> *	25286	<i>Streptococcus sanguis</i> *	10556
<i>Fusobacterium nucleatum sp. Nucleatum</i> *	25586	<i>Tannerella forsythia</i> **	43037
<i>Fusobacterium nucleatum sp. Polymorphum</i> *	10953	<i>Treponema denticola</i> **	81

Tabela 1 – Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano (conclusão)

<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp.	49256	<i>Treponema socranskii</i> (NEW D40DR2	
<i>Vicentii</i> *		1-6-99)**	
<i>Fusobacterium periodonticum</i> *	33693	<i>Veillonella díspar</i> *	17748
<i>Gemella morbillorum</i> *	27824	<i>Veillonella parvula</i> *	10790
<i>Haemophilus influenzae</i> *	33533	<i>Vibrio nereis</i> *	33895
<i>Helicobacter pylori</i> *	43504		

\* ATCC (American Type Culture Collection) \*\* FDC (FORSYTH DENTAL CENTER)

Fonte: O autor, 2013

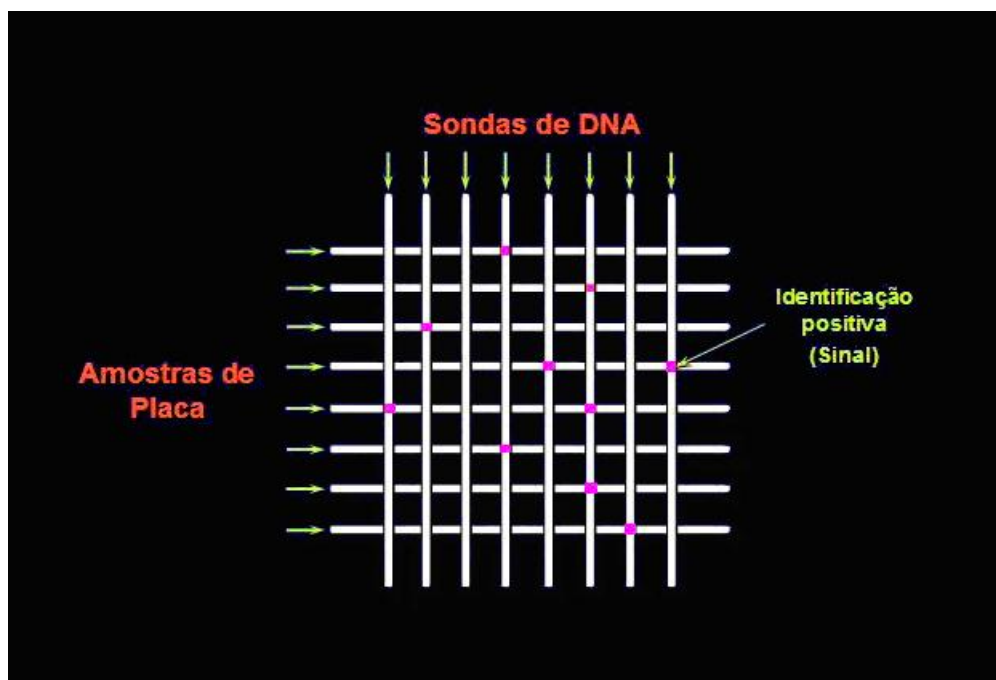
### 3.1.3 – Detecção das Espécies

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter 45*<sup>®</sup> e lavadas por quarenta minutos a 65 °C, numa solução adstringente de PO<sub>4</sub> *Buffer* (tampão de fosfato), a fim de remover sondas que não hibridizam completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por uma hora, sob agitação, numa solução bloqueadora contendo 0,1 M ácido maleico, 3M NaCl, 0,2M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0, e por trinta minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), numa diluição de 1/25.000 (ENGLER-BLUM, et al., 1993). As membranas foram, então lavadas com uma solução de 0,1M ácido maleico, 3M NaCl, 0,2M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, duas vezes por vinte minutos, e uma vez por cinco minutos, e uma vez por cinco minutos em 0,1M Tris HCl, 0,1 NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5. Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução detectora, *CDP-Star Detection Reagent*<sup>®</sup> (Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra, Reino Unido), por sessenta minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (Kodak<sup>®</sup> X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por aproximadamente quarenta minutos, e os filmes revelados logo em seguida.

Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> bactérias. Assim sendo, o número (0) era registrado quando não havia detecção do sinal; (1) equivalia a um sinal menos intenso que o controle de 10<sup>5</sup> células; (2) a aproximadamente 10<sup>5</sup>; (3) entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup>; (4) aproximadamente 10<sup>6</sup>; e (5) a mais de 10<sup>6</sup> células (TABELA 2). Esses registros foram então utilizados para determinar os diferentes níveis das espécies investigadas em cada amostra. Além disso, foram feitos registros quanto à

presença (>0) ou ausência (0) de cada espécie por amostra.

Figura 8 - Representação gráfica do padrão de hibridização das sondas de DNA com as bactérias presentes nas amostras dos canais radiculares em forma de tabuleiro de xadrez (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).



Fonte: MURAD, 2013

Tabela 2 – Índice utilizado para determinação do nível nas amostras dos canais radiculares e seus valores numéricos correspondentes

Índice	Nível do micro-organismo	Valor numérico
0	Não detectado	0
1	Menos de $10^5$	10.000
2	Aproximadamente $10^5$	100.000
3	Entre $10^5$ e $10^6$	500.000
4	Aproximadamente $10^6$	1.000.000
5	Mais de $10^6$	10.000.000

Fonte: O autor, 2013

### 3.1.4 – Análise dos Dados

A análise dos dados incluiu 19 amostras de canais radiculares de dentes apresentando infecção endodôntica primária, sendo onze incisivos e caninos, seis canais palatinos de pré-molares (birradiculares) e dois canais distais de molares inferiores.

Os dados microbiológicos foram expressos em porcentagem média de canais radiculares colonizados (prevalência) por cada espécie, proporção, e nível médio de cada espécie em cada dente. Posteriormente foi feita a média por grupo. Nas análises de prevalência, foram consideradas ausência (0) ou presença (>0) do micro-organismo. Os níveis das diferentes espécies foram determinados utilizando-se a média das frequências dos registros 0-5 em cada amostra (Tabela 2).

Diferenças entre os níveis de espécies individuais ou de grupos de espécies, dentro das condições clínicas avaliadas, foram detectadas por meio do teste *t* independente e correlação de Pearson. O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

No presente estudo foram utilizadas 19 amostras de canais radiculares de dentes apresentando infecção endodôntica primária, sendo onze incisivos e caninos, seis canais palatinos de pré-molares (birradiculares) e dois canais distais de molares inferiores. A amostra abrangeu pacientes entre 21 e 68 anos (média de 44,63 anos) sendo catorze do sexo masculino e cinco do sexo feminino (Apêndice D). Os dados clínicos analisados no presente trabalho estão apresentados no Apêndice E. O número de bactérias presentes nos casos analisados variou de 1 a 64, com uma média de 17 espécies diferentes por amostra, e nenhuma amostra com ausência total de detecção dos micro-organismos pesquisados.

Dos casos selecionados 15 eram assintomáticos e quatro apresentavam dor, sendo um caso apresentando dor espontânea e os outros três apresentando dor somente quando havia um estímulo prévio, 11 casos apresentavam restauração coronária satisfatória e oito apresentavam restauração deficiente ou ausente. Em 13 casos foi observada a presença de cárie. A presença de fístula foi verificada em quatro casos e todos os casos apresentavam lesão perirradicular com área variando de  $0,2\text{mm}^2$  a  $84,15\text{mm}^2$  (média de  $23,5\text{mm}^2$ ) e volume  $0,02\text{mm}^3$  a  $1215,2\text{mm}^3$  (média de  $234,1\text{mm}^3$ ). Três pacientes apresentaram dor à percussão.

O perfil da microbiota detectada foi inicialmente analisado em termos de prevalência levando-se em consideração apenas sua presença ou ausência. O Gráfico 1A mostra a prevalência das espécies avaliadas nas 19 amostras. Foi observada alta prevalência de *E. brachy* (70%), *S. pneumonia* (67,5%), *P. oris* (67,5%), *E. faecium* (65%), *N. gonorrhoeae* (62,5%), *K. pneumoniae* (62,5%), *P. melaninogenica* (62,5%), *P. nigrescens* (62,5%) e *P. micra* (62,5%). Algumas espécies demonstraram baixa prevalência, sendo elas, *T. forsythia* (7,5%), *E. limosum* (7,5%), *S. noxia* (7,5%), *T. socranskii* (7,5%), *P. acnes* (7,5%) e *A. actinomycetemcomitans* (7,5%). Não foi possível detectar a espécie *H. influenzae*.

Foram também determinadas as médias de contagem das 79 espécies avaliadas (Gráfico 1B) assim como a proporção média das sondas de DNA bacteriano (Gráfico 1C). A contagem das espécies foi obtida por meio dos valores atribuídos de acordo com os níveis detectados de cada micro-organismo durante a leitura dos filmes de *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (Tabela 2).

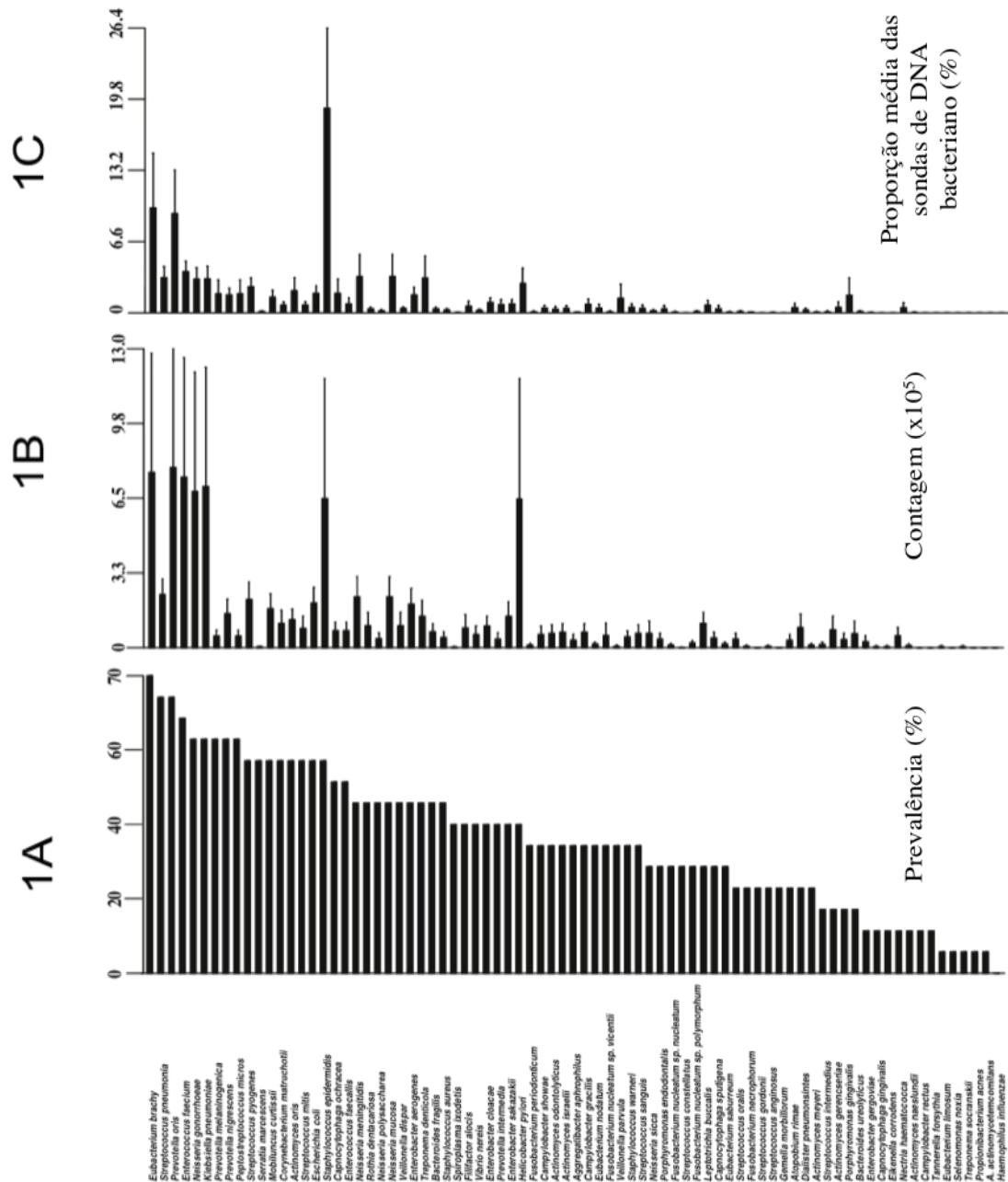
As espécies encontradas em níveis mais altos foram *P. oris* ( $7,5 \times 10^5$ ), *E. brachy* ( $7,3 \times 10^5$ ), *E. faecium* ( $7,2 \times 10^5$ ), *K. pneumoniae* ( $7,0 \times 10^5$ ), *N. gonorrhoeae* ( $6,8 \times 10^5$ ), *S.*

*epidermidis* ( $6,5 \times 10^5$ ) e *H. pylori* ( $6,5 \times 10^5$ ). As espécies encontradas em níveis mais baixos foram *S. marcescens* ( $0,1 \times 10^5$ ), *S. ixodetis* ( $0,1 \times 10^5$ ), *F. nucleatum sp. nucleatum* ( $0,05 \times 10^5$ ), *F. necrophorum* ( $0,05 \times 10^5$ ), *S. aeruginosus* ( $0,05 \times 10^5$ ), *A. naeslundii* ( $0,05 \times 10^5$ ) e *C. rectus* ( $0,05 \times 10^5$ ). e *P. endodontalis* ( $0,01 \times 10^5$ ) (Gráfico 1B).

A proporção média das sondas de DNA microbiano das 79 espécies bacterianas avaliadas está demonstrada no Gráfico 1C. As espécies encontradas em altas proporções foram *S. epidermidis* (19,5%), *E. brachy* (10,3%) e *P. oris* (9,4%). Cada espécie representou mais de 9% da microbiota total. Contudo, *E. limosum* (0,01%), *S. noxia* (0,01%), *T. socranskii* (0,01%), *P. acnes* (0,01%) e *A. actinomycetemcomitans* (0,01%), *C. gingivalis* (0,01%), *E. corrodens* (0,01%) e *S. ixodetis* (0,01%) foram detectados em menores proporções. Estas espécies representam menos de 0,1% da microbiota total avaliada (Gráfico 1C).

As espécies mais prevalentes *E. brachy* (70%) e *S. pneumoniae* (67,5%), também apresentaram os níveis médios mais altos, entretanto tiveram uma menor proporção média das sondas de DNA em comparação ao *S. epidermidis* que obteve a maior das médias (19,5%). Apesar das espécies *P. melaninogenica* (62,5%), *M. micra* (62,5%) e *S. marcescens* (57,5) apresentarem prevalência elevada, foi observada baixa contagem bacteriana. Inversamente, o *H. pylori* foi encontrado em sete casos apenas, porém apresentou níveis de contagem mais altos ( $6,5 \times 10^5$ ).

Gráfico 1– Prevalência (A), contagem (x 10<sup>5</sup> células bacterianas) dos níveis médios (B) e proporção média das sondas de DNA bacteriano (C) das 79 espécies bacterianas presentes nas 19 amostras avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a prevalência.



As espécies bacterianas foram agrupadas de acordo com sua forma, coloração de Gram e metabolismo respiratório (Apêndice F).

Em relação à forma, os bacilos ( $1014,9 \times 10^5$ ;  $n= 48$ ) e cocos ( $684,1 \times 10^5$ ;  $n= 23$ ) mostraram as médias de contagem mais altas em relação às espiroquetas ( $27 \times 10^5$ ;  $n= 2$ ) e cocobacilos ( $24,8 \times 10^5$ ;  $n= 4$ ) (Gráfico 2).

As espécies Gram-negativas foram detectadas em níveis mais altos ( $986,1 \times 10^5$ ;  $n= 45$ ) que as Gram-positivas ( $733,6 \times 10^5$ ;  $n = 32$ ) (Gráfico 3).

Os níveis bacterianos apresentados pelas espécies facultativas foram  $969,7 \times 10^5$  ( $n = 39$ ) e pelas anaeróbias estritas,  $602,4 \times 10^5$  ( $n = 36$ ), porém não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 4).

Gráfico 2 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas por forma.

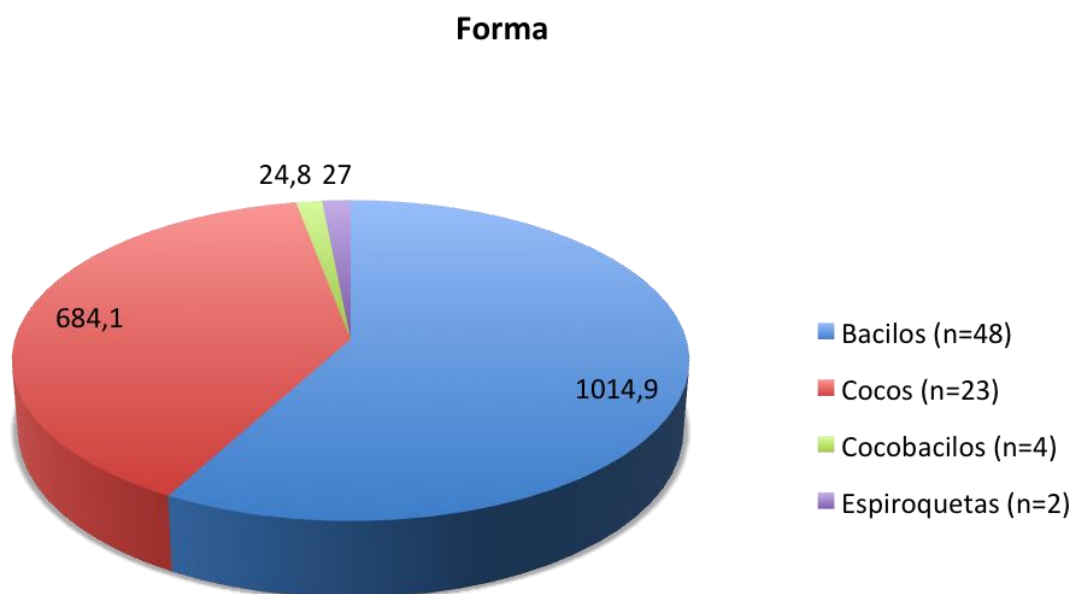




Gráfico 3 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas pela coloração de Gram.

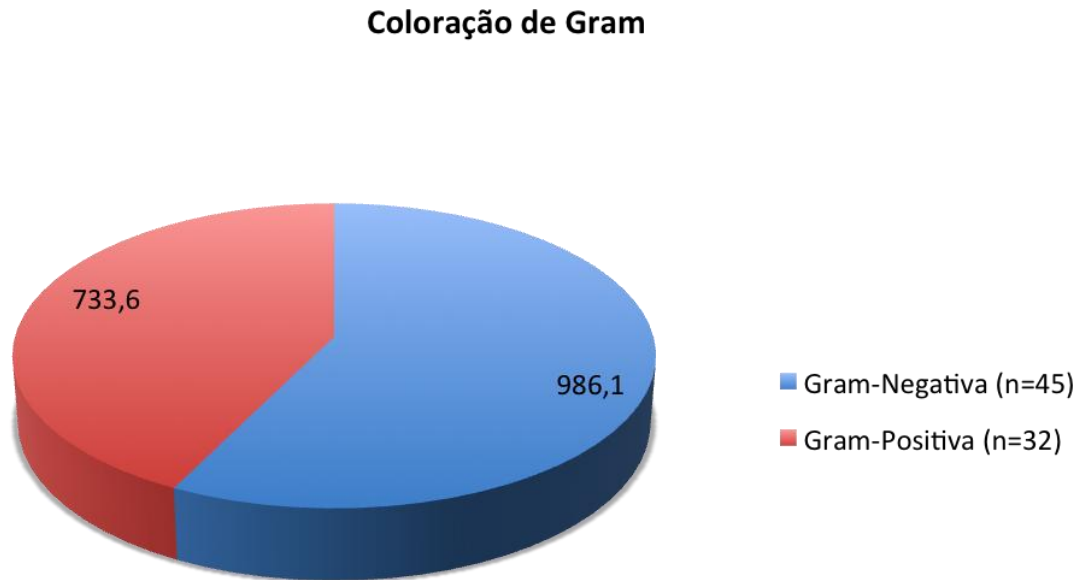
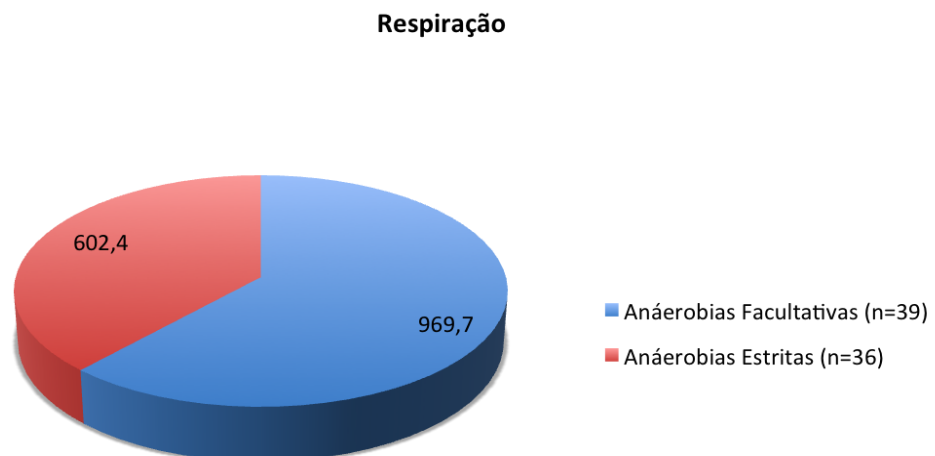


Gráfico 4 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas pelo metabolismo respiratório.



Foi realizada ainda outra forma de análise, na qual as 79 espécies bacterianas foram agrupadas por gênero e filo (Apêndice F). Os gêneros que apresentavam mais de duas espécies foram agrupados separadamente. Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem bacteriana entre os gêneros analisados ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 5), porém os gêneros *Neisseria* ( $233 \times 10^5$ ;  $n = 5$ ), *Prevotella* ( $194,4 \times 10^5$ ;  $n = 4$ ), *Enterococcus* ( $155,3 \times 10^5$ ;  $n = 2$ ) e *Eubacterium* ( $152,6 \times 10^5$ ;  $n = 4$ ) apresentaram os maiores níveis bacterianos médios.

Os Filos Proteobacteria ( $656,6 \times 10^5$ ;  $n = 21$ ), Firmicutes ( $556 \times 10^5$ ;  $n = 26$ ) e Bacteroidetes ( $256,6 \times 10^5$ ;  $n = 12$ ) apresentaram os maiores níveis bacterianos, respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas por gênero.

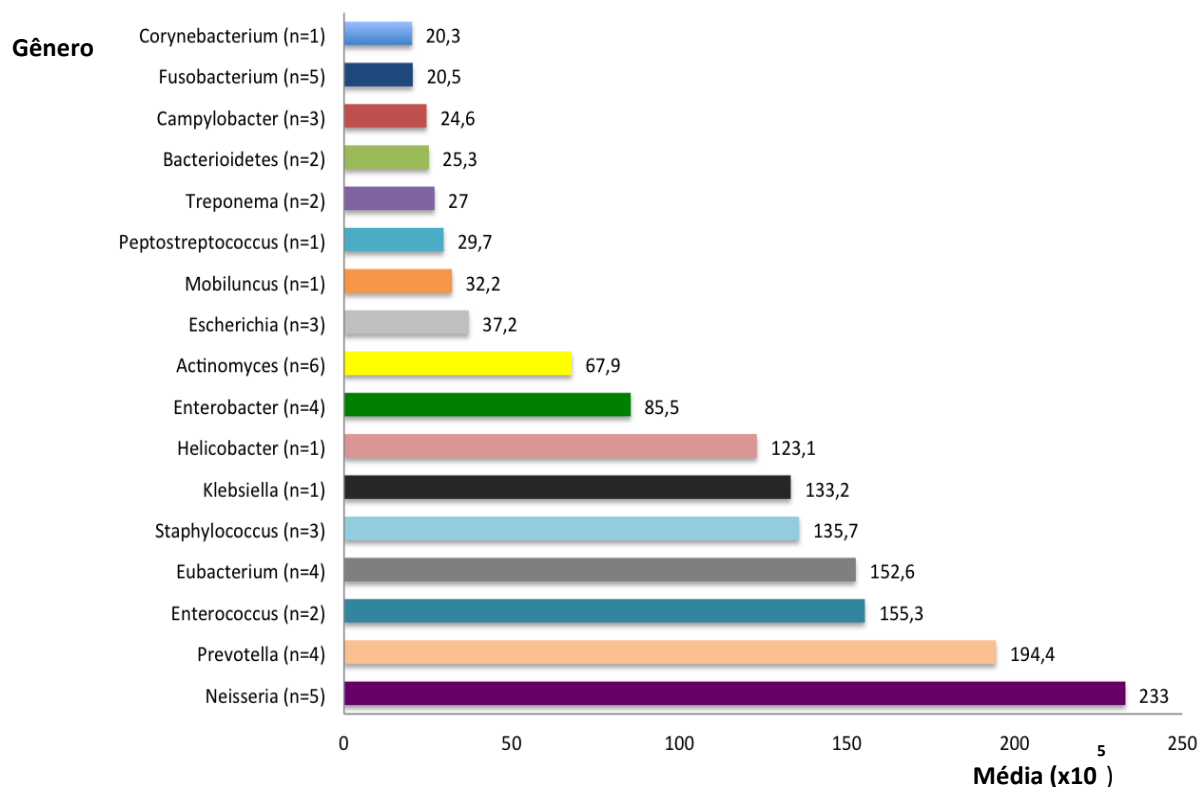
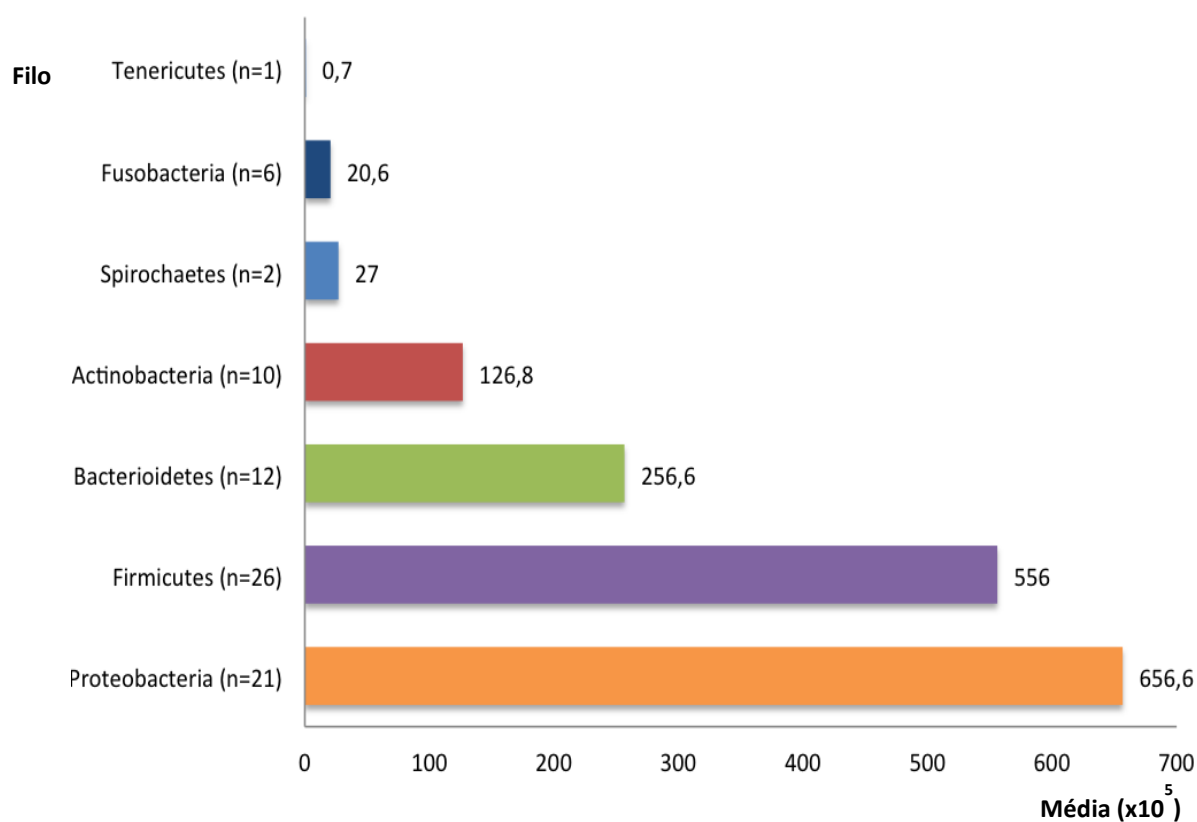


Gráfico 6 - Média dos níveis bacterianos ( $\times 10^5$  células bacterianas) das 79 espécies avaliadas agrupadas por filo.



Um dos principais objetivos deste estudo foi relacionar a composição da microbiota detectada nas amostras com a área e o volume das lesões perirradiculares associadas a cada caso. Em relação ao tamanho da lesão, foram notadas diferenças das áreas medidas por meio de tomada radiográfica e do tamanho obtido através do cálculo do volume por meio da tomografia.

Foram feitas correlações entre o tamanho da lesão em área ( $\text{mm}^2$ ) e em volume ( $\text{mm}^3$ ) e a microbiota detectada. Nas lesões perirradiculares de maior área, assim como nas de maior volume, foi detectada contagem significativamente maior de bactérias totais e Gram-negativas ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* é uma técnica *target*, isto é, ela possibilita a detecção de micro-organismos alvo, sendo quarenta espécies bacterianas em 28 amostras por teste. Possibilita a reutilização da membrana com outras sondas bacterianas. Devido a isto, foram utilizadas 79 espécies como objeto desta pesquisa. Estas espécies foram escolhidas por sua associação a infecções endodônticas primárias (SASSONE et al., 2007; SIQUEIRA JR. et al., 2000) secundárias (RÔÇAS; SIQUEIRA JR., 2010; RÔÇAS e SIQUEIRA JR., 2012) e periodontais (FAVERI et al., 2009; SOCRANSKY et al., 1994; TELES et al., 2007).

Essa técnica possibilita também determinar a prevalência, os níveis médios e a proporção percentual de cada espécie que faz parte desse biofilme endodôntico pesquisado, sendo assim trata-se de um método que avalia qualitativa e quantitativamente a amostra pesquisada (SOCRANSKY et al., 1994; JUNG et al., 2001; SASSONE et al., 2008). Assim foi possível avaliar se o tamanho das lesões perirradiculares estava relacionado somente à presença de determinada bactéria ou também à quantidade de bactérias presentes.

Dentre as espécies testadas foram encontradas até 64 espécies, sendo uma média de 17 espécies, por canal; estando assim em concordância com a literatura onde a infecção endodôntica primária é caracterizada como polimicrobiana e complexa (BRITO et al., 2007; SAKAMOTO, 2006; SASSONE et al., 2007; RÔÇAS; SIQUEIRA JR., 2012; SIQUEIRA JR. et al., 2000).

No presente estudo as espécies encontradas em maior prevalência foram *E. brachy* (70%) e *S. pneumoniae* e *P. oris* (ambos em 67,5% dos casos). Entretanto, em relação a contagem, *P. oris*, *E. brachy* e *E. faecium* apresentaram os maiores níveis. Em se tratando de proporções das sondas de DNA as maiores médias encontradas foram as das espécies *S. epidermides*, *E. brachy* e *P. oris* (Gráfico 1A, 1B e 1C).

Sundqvist, em 1976 já havia isolado bactérias do gênero *Eubacterium*, em canais com infecções primárias. Byström e Sundqvist, em 1981, encontraram em maior prevalência *P. oralis* e *E. alactolyticum*. Em um estudo mais recente Sassone et al. (2012), avaliaram a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias em casos associados à exposição pulpar e uma das bactérias mais prevalentes foi o *E. saburreum*. Embora todos esses estudos tenham encontrados altos níveis de micro-organismos do mesmo gênero (*Eubacterium*), todos divergem na espécie de maior prevalência, provavelmente por serem

estudos realizados com populações diferentes, o que faz com que a espécie de maior prevalência possa ser diferente (SIQUEIRA JR., 2001).

A espécie de maior prevalência foi a *E. brachy*, descrita pela primeira vez por Rocheford (1980), associada a infecções pulmonares, logo em seguida, no mesmo ano, Holdeman et al., conseguiram isolá-la juntamente com outras duas espécies de *Eubacterium*, a *E. timidum* e *E. nodatum* de amostras isoladas de periodontite humana. Em 1987, Hill et al., descreveram como sítios preferenciais de infecção por *E. brachy*, a cabeça, o pescoço e os pulmões. Hahn e Falkler Jr. (1992), descreveram pela primeira vez a presença de *E. brachy* em infecções endodônticas primárias e em dentes com cáries profundas; nesse estudo foram observados altos níveis de imunoglobulinas reagindo contra os patógenos associados a essas infecções, dentre eles o *E. brachy*. Munson et al. (2002), conseguiu identificar novamente essa bactéria através do método de sequenciamento de rDNA 16S.

A alta prevalência de *S. pneumoniae* (com 67,5% de prevalência) e sua associação com a *K. pneumoniae* (com 62,5%) levanta dados alarmantes, segundo Whitney et. al, em 2000. A primeira bactéria foi considerada como a causa mais comum de meningite, otite média e pneumonia, e a segunda é conhecida por sua alta resistência à antimicrobianos e com um papel importante em casos de pneumonias (KEYNAN; RUBINSTEIN, 2007). A *K. pneumoniae* (KPC) é uma bactéria que expressa resistência a até 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico, sendo uma das principais causas de falha terapêutica, a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) por esta bactéria (BRADFORD, 2001). Cepas produtoras de ESBL frequentemente apresentam resistência aos antimicrobianos de importância clínica, como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas (SPANU et al., 2002).

A espécie *P. oris* apresentou o maior nível de contagem bacteriana ( $7,5 \times 10^5$ ) e outras bactérias do gênero *Prevotella* que apresentaram prevalências altas, assim como a *P. oris* (67,5%), *P. nigrescens* (62,5%) e *P. micra* (62,5%), apareceram em altos índices. Molander et al. (1998), encontraram a prevalência de 15% de *Prevotella ssp.*, entretanto os autores utilizaram a técnica de cultura microbiana, o que pode justificar essa diferença. Siqueira Jr. e Rôças (2003), por meio de PCR, relataram *P. intermedia* em 10% e não detectaram *P. nigrescens*. Por outro lado, Gomes et al. (2005), encontraram *P. intermedia* em 10% e *P. nigrescens* em 12% das amostras, também por meio de PCR. Essa diferença pode se justificar pelo método de análise ser diferente do presente trabalho.

Sendo assim, era de se esperar que os trabalhos que utilizaram *Checkerboard DNA-DNA hybridization* encontrassem resultados semelhantes, entretanto variáveis como a escolha

e o número de espécies buscadas podem influenciar diretamente nos resultados, como pode ser visto em Sassone et al. (2007), que avaliou a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias. A presença de 40 espécies bacterianas foi determinada pelo método de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. As espécies encontradas em prevalências mais elevadas foram *F. nucleatum ssp. vincentii*, *V. parvula*, *T. socranskii*, *E. faecalis*, e *C. gracilis*. Já Rôças et al. (2008), detectaram a presença de *P. intermedia* em 29% das amostras, com alta contagem bacteriana utilizando o método de captura-reversa. Outro exemplo é Rôças e Siqueira Jr. (2009), que relataram a prevalência de três novos candidatos a patógenos orais: *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisacchari-Vorax*, e *Bacteroidetes X083 clone oral* em infecções endodônticas primárias. O DNA genômico foi isolado a partir de amostras coletadas a partir de 52 dentes com diferentes formas de periodontite apical. e *B. X083 clone oral*, *P. baroniae* e *P. multisaccharivorax* foram detectadas respectivamente em 81%, 43% e 38% dos canais radiculares de dentes associados com periodontite apical crônica, em 60%, 40% e 40% do canais de dentes com periodontite apical aguda, e em 14%, 24% e 5% dos aspirados de abscessos apicais agudos. O que demonstra que hoje detectam-se micro-organismos, que outrora sequer sabia-se da existência, e que devido ao desconhecimento não eram eleitos como alvo de pesquisa.

A espécie *E. faecium*, uma bactéria entérica, foi encontrada no presente estudo em prevalência e contagem bacteriana altas, 65% e  $7,2 \times 10^5$ , respectivamente. Esta espécie já foi detectada por cultura, em infecções primárias anteriormente, entretanto em baixas prevalências (DAHLÉN et al., 2000; FERRARI et al., 2005). Este micro-organismo apresenta capacidade intrínseca de sobreviver a agentes antimicrobianos, como a vancomicina, o que causa certa preocupação no meio médico, pois, apesar de ser considerado um patógeno de baixa virulência, possui a capacidade de transferir resistência a antimicrobianos para outros gêneros bacterianos (NAKAJO et al., 2004). Além disso, esta bactéria apresenta diversos genes de virulência (produção de substância de agregação, adesina de superfície, citolisina, gelatinase, entre outros), que aumentam seu grau de patogenicidade (DAHLÉN et al., 2000; FERRARI et al., 2005; SEDGLEY et al., 2006). Outra espécie do gênero *Enterococcus* foi testada no presente trabalho. O *E. faecalis* foi detectado em 50% dos casos, entretanto sua contagem *E. faecalis* pode ser considerada baixa, enquanto a do *E. faecium* foi a mais elevada. O *E. faecalis*, é um micro-organismo entérico que está envolvido na etiologia das infecções endodônticas persistentes (SEN, 2004; RÔÇAS et al., 2004; SIQUEIRA JR.; SUNDQVIST, 1992). Sua importância também está relacionada a características como alta resistência a agentes antimicrobianos (FERRARI et al., 2005), e sua capacidade de sobreviver

em ambientes adversos, com carência de nutrientes e pH alcalino extremo (9,6) facilitando a sobrevivência da mesma após o tratamento endodôntico e por isso ela é relacionada com casos de infecções persistentes (NAKAJO et al., 2004).

Já o *S. epidermidis* embora não possua uma prevalência muito alta (52,5%), apresentou altos níveis de contagem ( $6,5 \times 10^5$ ) e a maior proporção média das sondas de DNA (19,5%). Tronstad et al. (1990), já haviam identificado altos níveis desse patógeno. Trata-se de uma espécie comensal da pele e mucosas, responsável em sua maioria por infecções hospitalares, através de cateteres, sondas, bem como próteses, devido a sua capacidade de formar biofilmes. Os biofilmes dificultam a chegada de drogas antimicrobianas e até mesmo de células fagocíticas ao foco de infecção (TRONSTAD et al., 1990).

O *H. pylori*, espécie reconhecida como patógeno gástrico, foi identificada em alguns estudos, presente na cavidade oral (CHITSAZI et al., 2006). No presente trabalho, o *H. pylori* foi detectado em sete de 19 casos (36,84%), porém quando presente foi observado em alta contagem bacteriana. Até agora não foi encontrada correlação entre a presença de *H. pylori* na cavidade oral e no trato gástrico, uma vez que possui capacidade de contaminar a cavidade oral independente da colonização do sistema digestivo (BÜRGERS et al., 2008). Há um relato da presença de *H. pylori* em infecção endodôntica primária, onde por meio de *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e amplificação de DNA ele foi detectado em 52% das amostras de canais com polpas necróticas (BRITO et al., 2012). Em infecção persistente o *H. pylori* foi detectado em 11% dos casos, porém quando presente também foi observado em alta contagem bacteriana (MURAD, 2013).

A espécie *F. nucleatum* que foi a bactéria mais prevalente segundo Sassone et al, em 2008, ao avaliar a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias associados com dentes sintomáticos e assintomáticos e foi também detectada em alta prevalência nos estudos de Chugal et al. (2011); que por meio do PCR, detectaram sua presença em 80% dos 10 casos investigados. Rôças e Siqueira Jr. em 2009, utilizando a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* de captura reversa relataram sua presença em 24% das 42 amostras avaliadas. Entretanto, foi encontrada em prevalência moderada neste estudo (32,5%), isso pode ser justificado pelos seguintes fatos: a população pesquisada difere em número e época e as bactérias alvo diferiram em número e espécies. Além disso, os trabalhos de Chugal et al., (2011) e Rôças e Siqueira Jr. (2009); diferem também no método de análise (PCR).

Dois gêneros muito associados a infecções periodontais (GOMES et al., 2005) e que são encontrados com relativa prevalência em trabalhos sobre infecção primárias (SASSONE et al., 2007; RÔÇAS et al., 2001; RÔÇAS et al., 2003; RÔÇAS; SIQUEIRA JR., 2009), e que

foram encontrados entre os níveis mais baixos de contagem bacteriana no presente estudo, foram *Porphyromonas* e *Treponemas*. A primeira foi demonstrada pelo estudo de Gomes et al. (2005), como um micro-organismo de difícil cultivo e que só é bem detectada por métodos moleculares, já o segundo grupo são espiroquetas Gram-negativas, e frequentemente isoladas no biofilme subgengival (FAVERI et al., 2009). Sua participação na patogênese das periodontites apicais vem sendo investigada por diversos estudos (NOBREGA et al., 2013; RÔÇAS; SIQUEIRA JR. 2010). Essas diferenças podem ser justificadas pelos métodos de análises utilizados serem diferentes e pelo grupo de bactérias *target* (nos casos em que o método foi o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*) seguir diferentes opções.

Foi feito o agrupamento das espécies avaliadas de acordo com os diferentes gêneros e filos (Apêndice F). Observamos que os gêneros com contagens mais altas foram *Neisseria*, *Prevotella*, *Enterococcus* e *Eubacterium*. Já os gêneros com níveis mais baixos foram *Corynebacterium*, *Fusobacterium* e *Campylobacter* (Gráfico 5). A avaliação de filos presentes na amostra mostrou maior contagem bacteriana nos filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (Gráfico 6). Estes filos também foram os mais abundantes em outros estudos (SAKAMOTO et al., 2006; SHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2012), entretanto ressaltamos que comparações diretas devem ser realizadas com cautela, devido a quantidades diferentes de bactérias em cada grupo estudado. Murad (2013); encontrou resultados similares, tendo pesquisado as mesmas bactérias do presente trabalho, apesar de suas amostras serem provenientes de infecções persistentes.

A microbiota foi agrupada ainda, de acordo com sua forma, coloração de Gram e metabolismo respiratório (Apêndice F). As bactérias em forma de bacilos e cocos mostraram as médias de contagem mais altas, assim como as espécies Gram-negativas. Contudo também deve-se ter cuidado na análise deste resultado, uma vez que o estudo apresenta quantidades diferentes de bactérias Gram-negativas (n= 45) e Gram-positivas (n=32) e de formas bacilo (n= 48), coco (n= 23), espiroqueta (n= 2) e cocobacilar (n=4), o que pode ter influenciado o resultado.

Os níveis bacterianos apresentados pelas espécies facultativas foram maiores ( $969,7 \times 10^5$ , n= 39) que os apresentados pelas anaeróbias estritas ( $602,4 \times 10^5$ , n=36). Este perfil microbiológico é compatível com infecções endodônticas primárias e está em concordância com a literatura atual (RÔÇAS; SIQUEIRA JR., 2009; RÔÇAS e SIQUEIRA JR., 2010).

A periodontite apical é um processo inflamatório em torno do ápice radicular. Trata-se essencialmente de uma seqüela de uma infecção microbiana do espaço pulpar. Composta por um grupo restrito de micro-organismos orais, selecionadas por pressões ambientais de



anaerobiose, nutrição e competição com outras espécies (CHANDRA, 2009; FIGDOR; SUNDQVIST, 2007).

Trabalhos clássicos como o de Miller (1894) e Kakehashi et al., (1965), em concordância, comprovaram o papel das bactérias no desenvolvimento das lesões perirradiculares. Sundqvist, em 1976 e Möller et al., em 1981 demonstraram que na ausência de infecção, o tecido pulpar necrosado não pode induzir e perpetuar lesões de periodontite apical. Em concordância com estes trabalhos, o presente estudo encontrou lesão perirradicular em todos os casos analisados com área variando de  $0,2\text{mm}^2$  a  $84,15\text{mm}^2$  (média de  $23,5\text{mm}^2$ ) e volume  $0,02\text{mm}^3$  a  $1215,2\text{mm}^3$  (média de  $234,1\text{mm}^3$ ). A relação entre a microbiota detectada nas amostras com o tamanho e volume das lesões perirradiculares, demonstrou correlações positivas entre maior contagem total de micro-organismos e entre a maior contagem de bactérias gram-negativas. Nas lesões perirradiculares de maior área foram detectadas contagens significativamente de espécies Gram-negativas. Em discordância com o presente trabalho o estudo de Gomes et al. (2008); observaram correlação positiva entre os sinais clínicos e a microbiota, entretanto não houve relação entre a microbiota e a lesão perirradicular. Ratificando, em parte, os resultados do presente estudo, segundo Siqueira Jr. e Rôças (2008); quanto maior a lesão, mais complexa e diversificada é a microbiota que infecta esse sistema de canais radiculares. O que é corroborado por Chandra (2009) e Sundqvist e Figdor, que ainda afirmaram em 2007, que a periodontite apical, um processo inflamatório em torno do ápice radicular, é essencialmente uma seqüela de infecção microbiana do espaço pulpar. Neste mesmo trabalho, os autores relatam também a existência de uma correlação entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies de bactérias presentes no canal radicular. Sassone (2005); encontrou em casos com lesões com área maior ou igual a  $20\text{mm}^2$  uma maior proporção de bactérias do complexo azul, além de um ligeiro aumento na concentração bacteriana nesses casos.

Bornstein et al. (2009), já relatavam diferenças encontradas entre diagnósticos feitos através de exames tomográficos comparados a diagnósticos feitos por exames radiográficos. Cotti et al., em 1999, conseguiram delimitar com mais precisão a área de uma lesão com o auxílio de uma Tomografia Computadorizada Cone Beam (TCCB), em relação a uma radiografia periapical. As análises quantitativas em TCCB demonstram grande precisão em sua avaliação, em comparação com as radiografias convencionais, bem como a medição da imagem é mais assertiva à medida que se aproxima da dimensão real do objeto estudado (SCHULZE et al., 2004). Além disso, radiografias dão margem a interpretações diferentes,

dependendo do avaliador (LAMBRIANIDIS, 1985) e tomografias, possuem suas medidas de diâmetro estabelecidas pelo *software* de análise da imagem, tornando mais difíceis interpretações diferentes, mesmo que mais de um avaliador avalie estas imagens (YAMAMOTO, 2003). Com o avanço da tecnologia e o barateamento no custo desses exames, eles se tornam cada vez mais presentes na clínica diária do endodontista, auxiliando assim no diagnóstico e no planejamento do tratamento a ser executado. Entretanto ao compararmos a área da lesão em relação ao perfil microbiano, achamos resultados similares a quando avaliamos o volume, em relação ao mesmo aspecto, que foi quanto maior o tamanho da lesão maior o número de gram-negativas e de bactérias totais.

Diversos métodos têm sido utilizados com intuito de identificar e quantificar as bactérias presentes nas infecções endodônticas, nesse sentido o método do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* possui a vantagem de permitir a quantificação bacteriana de um grande número de espécies bacterianas, fornecendo um amplo perfil desta infecção. Entretanto, por ser uma técnica *target* limita os estudos microbiológicos a bactérias previamente selecionadas (PANTERA et al., 1988; SOCRANSKY, 1994). Conhecer os micro-organismos que colonizam o sistema de canais radiculares é um passo de extrema importância para a melhor compreensão dos processos patológicos perirradiculares. A formação desse biofilme endodôntico tem sido capaz de driblar mecanismos de proteção e imunidade dos hospedeiros (KEYNAN; RUBINSTEIN, 2007).

Micro-organismos que antes não faziam parte dos principais colonizadores das infecções endodônticas primárias, hoje se fazem presentes. Identificar essas bactérias será fundamental para combatê-las. Esforços na tentativa de se detectar novos patógenos do sistema de canais radiculares e sua associação a sinais e sintomas clínicos, como o tamanho da lesão perirradicular e sua redução após o tratamento endodôntico, devem continuar sendo realizados.

## CONCLUSÃO

A partir da proposição do trabalho, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, sugere-se que:

- a) A microbiota presente em dentes apresentando infecções endodônticas primária possui perfil misto e complexo, sendo as espécies *E. brachy*, *S. pneumonia*, *P. oris*, *E. faecium*, *N. gonorrhoeae*, *K. pneumoniae*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* e *P. micra* as mais prevalentes. As espécies encontradas com maior contagem bacteriana foram *P. oris*, *E. brachy*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *S. epidermidis* e *H. pylori*, as que apresentaram os maiores níveis e proporções de sondas de DNA foram *S. epidermidis*, *E. brachy* e *P. oris*.
- b) Houve correlação entre a microbiota detectada e o tamanho e volume da lesão. Nas lesões perirradiculares de maior área e volume foram detectadas contagens significativamente maiores de micro-organismos totais e espécies Gram-negativas.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-RASS, M.; BOGEN, G., Microorganisms in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v. 31, p. 39-47, 1998.
- ASSED, S.; et al., Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 12, n. 2, p. 66-69, Apr. 1996.
- BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER JR., W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J. Endod.**, v.17, n. 8, p. 380-383, Aug. 1991.
- BOGEN, G.; SLOTS, J., Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v. 32, n. 3, p. 204-210, May 1999.
- BORNSTEIN, M.M., et al., Comparison of intraoral radiography and limited cone beam computed tomography for the assessment of root-fractured permanent teeth. **Dent. Traumatol.**, v. 25, p. 571–577, 2009.
- BRADFORD, P.A., Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Rev. Clin. Microbiol.**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.
- BRITO, L.C. et al., Microbiologic profile of endodontic infections from HIV- and HIV+ patients using multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization. **Oral Dis.**, v. 18, n. 6, p. 558-97, 2012.
- BRITO, L.C.N., et al., Use of Multiple-Displacement Amplification and Checkerboard DNA-DNA Hybridization To Examine the Microbiota of Endodontic Infections, **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 3039–3049, Sept. 2007.
- BROWN JR, L.R.; RUDOLPH JR., C.E., Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 10, n. 10, p. 1094-1099, Oct. 1957.
- BÜRGERS, R.; et al., *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. **Eur. J. Oral Sci.** v. 116, n. 4, p. 297-304, 2008.
- BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G., Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 89, n. 4, p. 321-328, Aug. 1981.
- CHANDRA, A., Discuss the factors that affect the outcome of endodontic treatment. **Aust. Endod. J.**, v. 35, n.2, p. 98-107, Aug., 2009.
- CHAUDHRY, R.; et al., Anaerobic flora in endodontic infections. **Indian J. Med. Res.**; v. 105, p. 262-265, Jun. 1997.

CHITSAZI, M.T.; et al., *Helicobacter pylori* in the dental plaque: is it of diagnostic value for gastric infection? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 11, n. 4, p. 325-328, 2006.

CHUGAL, N.; et al., Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. **J. Endod.**, v. 37, n. 10, p. 1539-64, 2011.

COTTI, E.; et al., Computerized tomography in the management and follow-up of extensive periapical lesion. **Dent. Traumat.**, v. 15, p. 186-189, 1999.

DAHLÉN, G.; et al., Identification and antimicrobial susceptibility of Enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p. 309-312, 2000.

ENGLER-BLUM, R.; et al., reduction of background problems in nonreactive Northern and Southern blot analysis higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. **Anal biochem**, v. 132, p. 235-244, 1993.

FABRICIUS, L.; et al., Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 90, n. 2, p. 134-144, Apr. 1982.

FAVERI, M.; et al., Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 9, p. 739-749, 2009.

FERRARI, P.H.P.; CAI, S.; BOMBANA, A.C., Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 38, n. 6, p.372-380, June 2005.

FIGDOR, D.; SUDQVIST, G., A big role for the very small — understanding the endodontic microbial flora. **Austral. Dent. J.**, v. 52, p. 38-51, 2007.

FOSCHI, F.; et al., Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 289-295, Oct. 2005.

FOULIS, et al., **Cálculo**. 1<sup>a</sup>. ed.. LTC. v.1, 1982.

FUKUSHIMA, H.; et al., Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. **J. Endod.**, v. 16, n. 11, p. 534-538, Nov. 1990.

GOMES, B.P.F.A.; et al., *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, p. 211-215, 2005.

GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D., Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int. Endod. J.**, v.27, n. 6, p. 291-298, Nov. 1994.

GONÇALVES, R.B.; MOUTON, C., Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. **J. Endod.**, v. 25, n. 5, p. 336-340, May 1999.

HAHN, C.; FALKLER Jr.; W.A., Antibodies in normal and diseased pulps reactive with microorganisms isolated from deep caries. **J. Endodontol.**, v. 28, p. 28, 1992.

HILL, G.B.; AYERS, O.M.; KOHAN, A.P., Characteristics and sites of infection of *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy*, and other asaccharolytic eubacteria **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 1540, 1987.

HOLDEMAN, J.V., et al., Descriptions of *Eubacterium brachy* sp. nov., and *Eubacterium nodatum* sp. nov. isolated from human periodontitis, **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30, p. 163, 1980.

JACINTO, R.C.; et al., Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, n. 5, p. 285-292, Oct. 2003.

JACINTO, R.C.; et al., Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 39, n. 1, p. 62-70, Jan. 2006.

JUNG, I.Y.; et al., Identification of oral spirochetes at the species level, and their association with other bacteria in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 92, n. 3, p. 329-334, Sept. 2001.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J., The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 20, n. 3, p. 340-349, Sept. 1965.

KANTZ, W.E.; HENRY, C.A., Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. **Arch. Oral Biol.**, v. 19, n. 1, p. 91-96, Jan. 1974.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E., The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **Int. J. Ant. imicrob. Agents.** v.30, n.5, p.385-389, 2007.

KRANTZ; STEVEN G., **Calculus Demystified**. McGraw-Hill Professional, 2002. 343 p.

LAMBRIANDIS T., Observer variations in radiographic evaluation of endodontic therapy. **Endod. Dent. Traumatol.** v. 1, p. 235-241, 1985.

LANA, M.A.; et al., Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 16, n. 2, p. 100-105, Apr. 2001.

MATARAZZO, F.; et al., Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **J. Clin. Periodontol.** v. 35, p. 885-396, 2008.

MELVILLE, T.H.; BIRCH, R.H., Root canal and periapical floras of infected teeth. **Oral Surg.**, v. 23, n. 1, p. 93-98, Jan. 1967.

MILLER, W.D., An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent. Cosmos**, v. 36, n. 7, p. 505-528, July 1894.

MIMS, C.; et al., Mims' pathogenesis of infectious disease. 4th edn. **London: Academic Press**, 1995.

MOLANDER, A.; et al., Microbiological status of root-filled teeth with periapical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan. 1998.

MÖLLER, A.J.R.; et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res.** v. 89, p. 475-484, 1981.

MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H., The bacteria of periodontal diseases. **Perio 2000.** v. 5, p. 66-77, 1994.

MORAES, S.R.; et al., Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. **J. Endod.**, v. 28, n. 2, p. 86-89, Feb. 2002.

MUNSON, M.A.; et al., Molecular and cultural analyses os the microflora associated with endodontic infections., **J. Dent. Res.**, v. 81, p. 761, 2002

MURAD, C.F., Análise da diversidade microbiana em infecções endodônticas persistentes. 2013. 84f. Tese (Doutorado em Endodontia) – **Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2013.

NAIR, P.N.R., Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, Chicago, v. 13, n. 1, p. 29-39, Jan. 1987.

NAKAJO, K., et al., Alkali-resistant bacteria in root canal systems. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 390-394, 2004.

PANTERA JR., E.A.; ZAMBON, J.J.; SHIH-LEVINE, M., Indirect immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. **J. Endod.**, v. 14, n. 5, p. 218-23, May, 1988.

PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L., et al., Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 3770-3783, 2001.

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

PETTI, C.A.; POLAGE, C.R.; SCHRECKENBERGER, P., The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidenti- fied by conventional methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 6123-6125, 2005.

RÔÇAS, I. N.; HÜLSMANN, M.; SIQUEIRA Jr, J. F. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. **J. Endod.**, v. 34, n. 8, p. 926-31, 2008.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr, J. F. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 5, p. 1721-24, 2012.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA JR., J.F., Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 3599–3606, 2008.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR., J.F., Identification of Bacteria Enduring Endodontic Treatment Procedures by a Combined Reverse Transcriptase– Polymerase Chain Reaction and Reverse-Capture Checkerboard Approach, **J. Endod.**, v. 36, n.1, January 2010.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR., J.F., Prevalence of New Candidate Pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and As-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in Primary Endodontic Infections, **J. Endod.**, v. 35, n. 10, October 2009.

RÔÇAS, I.N.; et al., Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 1, p. 20-26, Jan. 2003.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR., J.F.; SANTOS, K.R., Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, v. 30, n. 5, p. 315-320, May 2004.

RÔÇAS, I.N.; et al., “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 91, n. 4, p. 468-471, Apr. 2001.

ROCHFORD, J.C., Pleuropulmonary infection associated with, *Eubacterium brachy*, a new species of *Eubacterium* **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 722, 1980.

SAKAMOTO, M.; et al., Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 275-281, 2008.

SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y., Molecular analysis of human oral microbiota. **J Periodontal Res.** v. 40, p. 277-285, 2006.

SASSONE L.M., Microbiota de infecções endodônticas primárias e sua relação com aspectos clínicos e radiográficos. Tese (Doutorado em Endodontia) – **Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2005.

SASSONE, L.M.; et al., A Microbiological Profile of Unexposed and Exposed Pulp Space of Primary Endodontic Infections by Checkerboard DNA-DNA Hybridization, **J. Endod.**, v. 38, n. 7, July 2012.

SASSONE, L.M.; et al., A Microbiological Profile of Symptomatic Teeth with Primary Endodontic Infections, **J. Endod.**, v. 34, n. 5, May 2008.

SASSONE, L.M.; et al., Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 390-397, Dec. 2007.

SCHULZE, D.; et al., Radiation exposure during midfacial imaging using 4- and 16-slice computed tomography, cone beam computed tomography systems and conventional



radiography. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 33, n. 2, p. 83-86, Mar. 2004.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O., Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **J. Endod.**, v. 32, n. 2, p. 104-109, Feb. 2006.

SEOL, J.H.; et al., Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, v. 32, n. 2, p. 110-114, Feb. 2006.

SHANG J., et al., Preliminary molecular analysis of bacterial composition in periapical lesions with primary endodontic infections of deciduous teeth. **Chin. Med. J.**, v. 126, p. 3112-3117, 2013.

SIQUEIRA JR., J.F., Aetiology of root canal treatment failure: why well treated teeth can fail. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 1-10, 2001.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 22, p. 266-271, 2007.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al., Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n. 5, p. 641-647, Jan. 2005.

SIQUEIRA JR., J.F.; LOPES, H.P., Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesion: a scanning electron microscopy study. **Int. Endod. J.**, v. 34, n. 3, p. 216-220, Apr. 2001.

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N., *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. **J. Endod.**, v. 29, n. 6, p. 390-393, June 2003.

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N., *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 3, p.174- 180, Mar. 2003 (a).

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N., Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. **J. Endod.**, v. 31, n. 7, p. 488-498, July 2005.

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N., *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. **J. Endod.**, v. 29, n. 11, p. 735-738, Nov. 2003.

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N., The microbiota of acute apical abscesses. **J. Dent. Res.**, v. 88, p. 61-65, 2009.

SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N., Update on endodontic microbiology: candidate pathogens and patterns of colonization. **ENDO**, v. 2, p. 7-20, 2008.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. **J. Endod.**, v. 29, n. 2, p. 111-113,

Feb. 2003.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al., Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 89, p. 744-748, 2000.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al., Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 89, n. 6, p. 744-748, June 2000.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al., Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 92, n. 4, p. 451-457, Oct. 2001.

SIQUEIRA JR., J.F.; et al., Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, n. 12, p. 1090-1096, Dec. 2002.

SIQUEIRA JR., J.F.; SEN, B.H., Fungi in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n. 5, p. 632-641, May 2004.

SOCRANSKY, S.S.; et al., Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 6, p. 352-362, Dec. 2004.

SOCRANSKY, S.S.; et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques.** v. 17, p. 788-792, 1994.

SOCRANSKY, S.S.; et al., "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 788-892, Oct. 1994.

SOUSA, E.L.R.; et al., Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 96, n. 3, p. 332-339, Sept. 2003.

SPANU, T., et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.46, n.1, p.196-202, 2002.

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

SUNDQVIST, G., **Bacteriological studies of necrotic dental pulps.** Tese (PhD) – Universidade de Umea, Suécia, 1976.

TELES R.P.; et al., A three-year prospective study of adult subjects with gingivitis II: microbiological parameters. **J. Clin. Periodontol.** v. 34, p. 7-17, 2007.

TRONSTAD, L.; KRESHTOOL, D.; BARNETT, F., Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 6, p. 129-136, 1990.

VIANNA, M.E.; et al., Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard

hybridization in relation to culture. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 282-290, 2008.

WHITNEY, C.G.; et al., Increasing Prevalence of Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. **Engl. J. Med.** v. 343, p. 1917-1924, 2000.

YAMAMOTO, K., Development of dento-maxillofacial cone beam X-ray computed tomography system. **Orthod. Craniofac. Res.**, Oxford, v. 6, p.160-162, 2003.

ZAVISTOSKI, J.; et al., Quantitative bacteriology of endodontic infections. **Oral Surg.**, St. Louis, v. 49, n. 2, p. 171- 174, Feb. 1980.

ZHANG, C., et al. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. **Chin. Med. J.** v. 125, n. 6, p. 1163-1168, 2012.

**APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido**

---

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**PAVILHÃO DE PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado Sr (Sra):

A pesquisa da qual você está sendo convidado a participar visa determinar os micro-organismos responsáveis pelas infecções persistentes nos canais radiculares.

Para participar deste estudo é necessário não ter doença periodontal, não estar grávida nem amamentando e estar com boa saúde geral.

Como um dos principais objetivos deste estudo é relacionar dor com as bactérias presentes nos canais radiculares é fundamental que seja feito um relato claro caso você sinta algum tipo de dor relacionada ao dente que será tratado. Da mesma forma, qualquer alteração na sua saúde geral ou qualquer medicamento tomado durante o tempo que você estiver no estudo também deve ser comunicado ao pesquisador.

O protocolo da pesquisa envolve: exame clínico e radiográfico, abertura coronária do dente, coleta de amostras do canal radicular e retratamento endodôntico deste. Todos os procedimentos serão efetuados por profissionais qualificados. Seu tratamento será realizado em no máximo 2 consultas e você será chamado para consultas de acompanhamento no período de 6 meses e depois anualmente.

O benefício individual será o recebimento de tratamento endodôntico por profissionais/ alunos capacitados. Os resultados de seus exames, clínicos e laboratoriais, serão confidenciais e você poderá requisitá-los quando quiser.

Finalmente, você estará à vontade para desistir de participar desse estudo, a qualquer momento, sem prejuízo ao seu tratamento. Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, solicitamos que você date e assine esse formulário de consentimento.

Declaro ter lido e entendido os termos da presente pesquisa e, portanto, consinto em participar, abaixo assinado

Rio de Janeiro \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, \_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Rio de Janeiro \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, \_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

**APÊNDICE B – Anamnese**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**PAVILHÃO DE PESQUISA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ n<sup>o</sup> \_\_\_\_\_

apt. \_\_\_\_\_ bloco/conjunto \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_

CEP \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Telefones: Res. \_\_\_\_\_ trab1. \_\_\_\_\_ trab.2 \_\_\_\_\_ cel. \_\_\_\_\_

recado. \_\_\_\_\_ (falar com \_\_\_\_\_) outros \_\_\_\_\_

Estado civil: \_\_\_\_\_ Profissão \_\_\_\_\_

**Questionário Médico**

1. Nome do seu médico (se houver) \_\_\_\_\_

2. Telefone: \_\_\_\_\_

3. Data do último exame médico: \_\_\_\_\_

4. Você já foi hospitalizado(a)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS

5. Em caso de resposta positiva, qual o motivo ? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. Você está sob cuidados médicos? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS

7. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

8. Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:
- a) Doenças congênitas do coração? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- b) Doenças cardíacas (ex: enfarte, angina, derrame, pressão alta/baixa)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
  - Inchaço nos pés ou nos tornozelos? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
  - Dor, pressão ou mal estar no peito? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- c) Febre reumática? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- d) Endocardite bacteriana? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- e) Sopros no coração? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- f) Desmaios convulsões ou epilepsia? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- g) Dor de cabeça freqüente (2 ou mais vezes por semana)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- h) Tratamento nervoso? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- i) Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- j) Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- k) Artrite ou dores articulares? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- l) Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- m) Diabetes? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- Demora na cicatrização dos ferimentos? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
  - Você urina mais de seis vezes por dia? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
  - Você sente sede a maior parte do tempo? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- n) Problemas sangüíneos (ex: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemesa, hemotúria, epistaxes)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- o) Úlceras ou outros problemas estomacais? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
- p) Reação alérgica: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
8. Você já sofreu transfusão sangüínea? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
9. Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
10. Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
11. Você teve uma variação recente no apetite? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
12. Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS

**Somente para mulheres**

13. Você está grávida? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
14. Em caso de resposta positiva, há quantos meses? \_\_\_\_\_
15. Você já passou pela menopausa? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS
16. Você está tomando algum hormônio? \_\_\_\_\_ Sim / Não / NS

Declaro serem verdadeiras todas as informações por mim fornecidas nos questionários acima.

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data

**APÊNDICE C – Anamnese odontológica**

---

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**PAVILHÃO DE PESQUISA**  
**QUESTIONÁRIO ENDODÔNTICO:**  
 (preenchido pelo profissional)

Paciente n°: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Tipo dentário: \_\_\_\_\_

**Dados Subjetivos:**

1. Dor no momento? \_\_\_\_\_ Sim / Não
2. Em caso de resposta positiva:
  - a) ( ) espontânea ( ) provocada
  - b) Declínio: ( ) rápido ( ) lento
  - c) ( ) difusa ( ) reflexa ( ) localizada
  - d) Duração: ( ) longa ( ) curta
  - e) Acentuada: ( ) frio ( ) calor
  - f) Aliviada: ( ) frio ( ) calor
  - g) Dor: ( ) à palpação ( ) à percussão
3. Já sentiu dor relativa a este dente em alguma outra época \_\_\_\_\_ Sim / Não
4. Este dente já sofreu algum tipo de intervenção endodôntica \_\_\_\_\_ Sim / Não

**Dados Objetivos:**

5. Cárie? \_\_\_\_\_ Sim / Não
6. Restauração? \_\_\_\_\_ Satisfatória / Insatisfatória
7. Presença de fístula? \_\_\_\_\_ Sim / Não
8. Edema: \_\_\_\_\_ Sim / Não
9. Sensibilidade a percussão \_\_\_\_\_ Sim / Não
10. Mobilidade \_\_\_\_\_ Sim / Não
11. Doença periodontal \_\_\_\_\_ Sim / Não
12. Exudato \_\_\_\_\_ Presente / Ausente
13. Exame radiográfico:
  - a) Lesão perirradicular: ( ) difusa ( ) circunscrita
  - b) Área aproximada da lesão (em mm<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_
  - c) Qualidade radiográfica da obturação do canal radicular \_\_\_\_\_ Satisfatória / Insatisfatória



**APÊNDICE D** – Dados dos pacientes

---

Tabela 3 – Dados dos pacientes

<b>Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Gênero</b>	<b>Dente</b>
<b>1</b>	21	masculino	21
<b>2</b>	23	masculino	21
<b>3</b>	55	masculino	24
<b>4</b>	50	feminino	23
<b>5</b>	56	masculino	25
<b>6</b>	22	masculino	22
<b>7</b>	65	feminino	46
<b>8</b>	62	masculino	11
<b>9</b>	68	feminino	21
<b>10</b>	25	feminino	25
<b>11</b>	42	masculino	21
<b>12</b>	31	masculino	11
<b>13</b>	54	feminino	24
<b>14</b>	67	masculino	15
<b>15</b>	58	masculino	11
<b>16</b>	24	masculino	25
<b>17</b>	46	masculino	15
<b>18</b>	46	masculino	22
<b>19</b>	33	masculino	21

**APÊNDICE E – Sinais e sintomas**
**Tabela 4 – Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes**

<b>Amostra</b>	<b>Restauração</b>	<b>Cárie</b>	<b>Dor</b>	<b>Mobilidade</b>	<b>Percussão</b>	<b>Dor Prévia</b>	<b>Secreção</b>	<b>Fístula</b>
1	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
2	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
4	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
6	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
8	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
9	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
10	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
11	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
12	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
13	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
14	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
16	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
17	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
18	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
19	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente

**APÊNDICE F** – Classificação das 79 espécies bacterianas

Tabela 5 – Classificação das 79 espécies bacterianas em relação a sua forma

Forma	Bactérias	
Coco	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>G. morbillorum</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>N. mucosa</i> <i>N. polysaccharea</i> <i>N. sicca</i> <i>P. micra</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. warneri</i>	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. pneumonia</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. sanguis</i> <i>V. díspar</i> <i>V. parvula</i>
Bacilo	<i>A. naeslundii</i> <i>A. israelii</i> <i>A. gerencseriae</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. oris</i> <i>A. rimae</i> <i>B. fragilis</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. rectus</i> <i>C. showae</i> <i>C. gingivalis</i> <i>C. ochracea</i> <i>C. sputigena</i> <i>C. matruchotii</i> <i>D. pneumosintes</i> <i>E. corrodens</i> <i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. gergoviae</i> <i>E. sakazakii</i> <i>E. coli</i> <i>E. brachy</i> <i>E. limosum</i>	<i>E. nodatum</i> <i>E. saburreum (NEW 1-6-99)</i> <i>F. alocis</i> <i>F. necrophorum</i> <i>F. nucleatum sp. nucleatum</i> <i>F. nucleatum sp. polymorphum</i> <i>F. nucleatum sp. vicentia</i> <i>F. periodonticum</i> <i>H. pylori</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>L. buccalis</i> <i>M. curtissii</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. evotella oris</i> <i>P. opionibacterium acnes I</i> <i>S. lenomonas noxia</i> <i>S. marcescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>V. nereis</i>
Espiroqueta	<i>T. denticola</i> <i>T. socranskii (NEW 1-6-99)</i>	
Coco-bacilar	<i>A. aphrophilus</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>serotypes-a</i>	<i>H. influenzae</i> <i>R. dentacariosa</i>

Tabela 6 – Classificação das 79 espécies bacterianas em relação à coloração de Gram

GRAM-POSITIVO	GRAM-NEGATIVO
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes-a</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>Bacteroides ureolyticus</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Atopobium rimaie</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
<i>Eubacterium brachy</i>	<i>DialisterPneumosintes</i>
<i>Eubacterium limosum</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Eubacterium saburreum (NEW 1-6-99)</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Filifactor alocis</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>
<i>Parvimonas micra</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Propionibacterium acnes I</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Rothia dentacariosa</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum</i>
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. vicentii<sup>a</sup></i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Streptococcus pneumonia</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	<i>Prevotella intermedia</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Prevotella nigrescens</i>
	<i>Prevotella oris</i>
	<i>Selenomonas noxia</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Tannerella forsythia</i>
	<i>Treponema denticola</i>
	<i>Treponema socranskii (NEW 1-6-99)</i>
	<i>Veillonella dispar</i>
	<i>Veillonella parvula</i>
	<i>Vibrio nereis</i>

\* *Mobiluncus curtissii* possui coloração por Gram variável \*\* *Nectria haematococca* não cora pelo método de Gram

Tabela 7 – Classificação das 79 espécies bacterianas em relação ao metabolismo respiratório

Facultativos	Anaeróbios estritos
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Atopobium rimae</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Bacteroides ureolyticus</i>
<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>serotypes-a</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Dialister Pneumosintes</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Eubacterium brachy</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Eubacterium limosum</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Eubacterium saburreum (NEW 1-6-99)</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Filifactor alocis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. vicentii<sup>a</sup></i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>Neisseria polysaccharea</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Neisseria sicca</i>	<i>Mobiluncus curtissii</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Prevotella oris</i>
<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Treponema socranskii (NEW 1-6-99)</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Veillonella díspar</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Streptococcus pneumonia</i>	<i>Propionibacterium acnes I</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Streptococcus sanguis</i>	
<i>Vibrio nereis</i>	

\* *R. dentacariosa* é aeróbia

\*\* *H. pylori* é microaerófilo


Tabela 8 – Classificação das 79 espécies bacterianas em relação ao gênero

Gêneros	Bactérias	
<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> <i>A. gerencseriae</i> <i>A. naeslundii</i> <i>genospecies I</i>	<i>A. meyeri</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. oris</i>
<i>Aggregatibacter</i>	<i>A. aphrophilus</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>serotypes-a</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. ureolyticus</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>C. rectus</i> <i>C. gracilis</i>	<i>C. showae</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i> <i>C. ochracea</i>	<i>C. sputigena</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i>	<i>E. gergoviae</i> <i>E. sazakii</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>E. brachy</i> <i>E. limosum</i>	<i>E. nodatum</i> <i>E. saburreum</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>vincentii</i>	<i>F. periodonticum</i> <i>F. necrophorum</i>
<i>Neisseria</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>N. mucosa</i>	<i>N. polysaccharea</i> <i>N. sicca</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>
<i>Prevotella</i>	<i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i>	<i>P. nigrescens</i> <i>P. oris</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. mitis</i>	<i>S. oralis</i> <i>S. pneumonia</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. sanguis</i>
<i>Treponema</i>	<i>T. denticola</i>	<i>T. socranskii</i>
<i>Veillonella</i>	<i>V. dispar</i>	<i>V. parvula</i>
outros	<i>A. rimae</i> <i>C. matruchotii</i> <i>D. pneumosintes</i> <i>E. coli</i> <i>E. corrodens</i> <i>F. alocis</i> <i>G. morbillorum</i> <i>H. influenzae</i> <i>H. pylori</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>L. buccalis</i>	<i>M. curtisii</i> <i>P. micra</i> <i>N. hemotococca</i> <i>P. acnes</i> <i>R. dentacariosa</i> <i>S. ixodetis</i> <i>S. marcescens</i> <i>S. noxia</i> <i>T. forsythia</i> <i>V. nereis</i>

Tabela 9 – Classificação das 79 espécies bacterianas em relação ao Filo

Filos	Bactérias
Actinobacteria	<i>A. israelii</i> <i>A. gerencseriae</i> <i>A. naeslundii</i> <i>genospecies I</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. oris</i> <i>A. rimae</i> <i>C. matruchotii</i> <i>M. curtisii</i> <i>P. acnes</i>
Proteobacteria	<i>A. aphrophilus</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>serotypes-a</i> <i>C. rectus</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. showae</i> <i>E. corrodens</i> <i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. gergoviae</i> <i>E. sazakii</i> <i>E. coli</i> <i>H. influenzae</i> <i>H. pylori</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i> <i>N. mucosa</i> <i>N. polysaccharea</i> <i>N. sicca</i> <i>S. marcescens</i> <i>V. nereis</i>
Firmicutes	<i>D. pneumosintes</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. brachy</i> <i>E. limosum</i> <i>E. nodatum</i> <i>E. saburreum</i> <i>F. alocis</i> <i>G. morbillorum</i> <i>P. micra</i> <i>S. noxia</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. warneri</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. pneumonia</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. sanguis</i> <i>V. dispar</i> <i>V. parvula</i>
Fusobacteria	<i>F. nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>vincentii</i> <i>F. periodonticum</i> <i>F. necrophorum</i> <i>L. buccalis</i>
Bacteroidetes	<i>B. fragilis</i> <i>B. ureolyticus</i> <i>C. ochracea</i> <i>C. gingivalis</i> <i>C. sputigena</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. oris</i> <i>T. forsythia</i>
Spirochaetes	<i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i>
Tenericutes	<i>S. ixodetis</i>
Ascomycota	<i>N. hemotococca</i>

## ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

	<b>HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO</b>	
--	-----------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

---

**PROJETO DE PESQUISA**


---

**Título:** Perfil microbiano de infecções endodônticas primárias e sua relação com o volume de lesões perirradiculares associadas

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 05789012.8.0000.5259

**Pesquisador:** João Marcelo da Silva Teixeira

**Instituição:** Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**


---

**Número do Parecer:** 102.647

**Data da Relatoria:** 19/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O projeto está bem apresentado

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar uma possível relação entre o tamanho de lesões periapicais e a microbiota presente nos canais radiculares

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos. O benefício será o recebimento do tratamento endodôntico

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante e pode trazer conhecimentos valiosos

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Toda a documentação pertinente foi apresentada

**Recomendações:**

Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O trabalho pode ser realizado da forma como se apresenta

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo		CEP: 20.551-030
Bairro: Vila Isabel		
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	
Telefone: (21)2566-8253	Fax: (21)2264-0853	E-mail: cep-hupe@uerj.br