



VIVIAN MARIA TELLAROLI RODRIGUES



DETECÇÃO DA MICROBIOTA ENDODÔNTICA DE DENTES SEM VITALIDADE PULPAR COM OU SEM LESÃO PERIAPICAL RADIOGRÁFICA, POR MEIO DAS TÉCNICAS DE *CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION* E CULTURA MICROBIOLÓGICA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Endodontia.

Orientador:

Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Araraquara
2006

Rodrigues, Vivian Maria Tellaroli

Detecção da microbiota endodôntica de dentes sem vitalidade pulpar com ou sem lesão periapical radiográfica, por meio das técnicas de checkboard DNA-DNA hybridization e cultura microbiológica / Vivian Maria Tellaroli Rodrigues. – Araraquara: [s.n.] 2006.

109 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

1. Endodontia 2. Bactérias 3. Técnicas microbiológicas
4. Biologia molecular 5. Cavidade da polpa dentária I. Título.

VIVIAN MARIA TELLAROLI RODRIGUES

DETECÇÃO DA MICROBIOTA ENDODÔNTICA DE DENTES SEM
VITALIDADE PULPAR COM OU SEM LESÃO PERIAPICAL RADIOGRÁFICA POR
MEIO DAS TÉCNICAS DE *CHECKERBOARD* DNA-DNA *HYBRIDIZATION* E
CULTURA MICROBIOLÓGICA.

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

2º Examinador: Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Araraquara, 26 de setembro de 2006.

Dados Curriculares

Vivian Maria Tellaroli Rodrigues

Nascimento	30 de Junho de 1979 -AraraquaraSP
Filiação	Luiz Ernesto Rodrigues (in memorian) Margarida Tellaroli Rodrigues (in memorian)
19982001	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP-FOAr
2001	Curso de Atualização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP-FOAr
20022003	Estágio de Atualização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP-FOAr
20042006	Curso de Pós-graduação em Endodontia, nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP-FOAr

Dedicatória

Deus, muito tenho a Te agradecer, a todo o momento, não só pela vida que me destes, mas por me encorajar a segui-la, sempre, com perseverança e muita fé...

Aos meus amados pais, Luiz e Margarida

Papai querido, de onde estiver, sinta essa nossa conquista...

Te amo muito, pra sempre...

Mamãe querida, quantos obstáculos transpusemos juntas e estamos aqui, celebrando essa vitória. Obrigada pelos esforços que fizeram e privações que suportaram para que eu tenha chegado até aqui.

Te amo sempre.

Ao meu amor Fabrício,

Sempre não medindo esforços para que eu seja feliz...

Obrigada pelos incansáveis apoio e incentivo, por toda paciência e por seu imensurável amor. Amo você!

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Exemplo de orientador, com incomparáveis caráter, dignidade, retidão e devoção à Endodontia. Palavra sempre amiga, paciente com meus erros, reconhecendo meus acertos, acalmando-me nas horas certas. Agradeço por todas as oportunidades oferecidas, por todo o ensino transmitido, por todas as palavras acolhedoras e, por ter me infundido, no 3º ano da Graduação, o desejo ímpar de me dedicar à carreira acadêmica. Obrigada, mestre e amigo. Serás sempre o meu espelho...

À Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Grande amiga e professora, obrigada por todo o tempo despendido com minha tão sonhada pesquisa. Sua contribuição foi fundamental para a conclusão dessa dissertação que hoje apresento. Obrigada, ainda, pelas suas orações e carinhosas palavras que me incentivam a prosseguir, sempre.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo

Que imenso prazer ter sido sua aluna, sua devoção e seu amor à Endodontia são contagiantes. A facilidade com que transmite seus conhecimentos, tal e qual um maestro rege sua orquestra, me faz sonhar ainda mais com a magnífica carreira acadêmica.

Aos Professores da Disciplina de Endodontia: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert e Prof. Dr. Marcelo Gonçalves

Um obrigado muito carinhoso pelo trabalho de todos. Cada um com uma personalidade, mas todos **sempre** amáveis, amigos, dedicados à Endodontia. Obrigada por toda a acolhida que sempre recebi, por todos os ensinamentos transmitidos, todos os momentos de descontração vividos. Vou sempre guardar doces lembranças desse curso de mestrado.

À Profa. Dra. Isabel Yoko Ito

Mesmo à distância, sempre contribuindo de forma esplendorosa para a realização deste trabalho. Que exemplo admirável de amor à docência e à pesquisa. Espero levar seu exemplo para toda minha vida.

À Profa. Dra. Ana Paula Vieira Colombo

Quero agradecê-la por toda a atenção, disponibilidade e tempo despendidos com este trabalho. Sua contribuição foi valiosa.

Ao serviço de Emergência da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, Guto, Fernando, Ângela, Fátima, Marisa, Olga, Bernadete e Mário

Por toda a torcida e todo o apoio para que eu concluísse essa dissertação. Muito obrigada pelo consolo nas horas difíceis e pela paciência e prontidão com que sempre me atenderam. Podem estar certos que todos moram para sempre no meu coração.

Aos queridos colegas do curso de mestrado, Regina, Fabíola, Julio César, Freddy, Fernando e Gustavo

Obrigada pela amizade e carinho com que sempre me trataram. Por toda a ajuda com os seminários, fotos, casos clínicos... Aprendi muito com cada um de vocês, e sempre, os terei guardados em meu coração. Adoro vocês!

À Lena

Obrigada pela mão amiga sempre estendida, pelos ouvidos atentos e pelas sábias palavras...

À minha amada e preciosa família, sempre unidos, superando todos os momentos difíceis, me acompanhando em cada momento desta trajetória, mesmo que à distância, como no caso dos meus familiares de sangue, que moram longe a maioria... me proporcionando suporte e me enchendo de carinho, como a família do Fabrício, agora minha família também... E à Zíha, querida, minha fiel escudeira...

Agradecimentos

À Direção da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –UNESP, nas pessoas da Diretora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio e do Vice-diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, Sra. Célia, Sra. Creuza, Sr. Pedro, Sr. Mário e Sra. Luíza, pela amizade, carinho, prontidão e compreensão com que sempre me atenderam.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, turma de Doutorado em Endodontia pela amizade e convívio durante a realização do curso.

À colega de Mestrado em Endodontia, turma 2006/2007, Érica G. Jorge, por toda a cooperação e por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

À funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, Mara, Vera, Rosângela e Sílvia, por toda paciência, atenção e carinho dedicados a este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Endodontia, obrigada pela sincera amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pelos bons momentos vividos.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, por toda colaboração no desenvolvimento da metodologia deste trabalho, um muito obrigado caloroso.

Ao Prof. Dr. Romeu Magnani, pela valiosa e enriquecedora contribuição na análise estatística deste trabalho.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3	PROPOSIÇÃO.....	48
4	MATERIAL E MÉTODO.....	49
5	RESULTADO.....	61
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÃO.....	88
8	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO.....	104
	RESUMO.....	108
	ABSTRACT.....	109

1 Introdução

Microorganismos e seus produtos representam agentes etiológicos primários da necrose pulpar e do desenvolvimento das lesões periapicais (KAKEHASHI et al.⁴³, 1965; MÖLLER et al.⁵⁴, 1981; BONIFÁCIO⁸, 2000; PETERS et al.⁶⁴, 2001), sendo sua eliminação de fundamental importância para obtenção do sucesso do tratamento de canais radiculares. Desta forma, os insucessos têm relação direta com a dificuldade de controle e eliminação da infecção endodôntica (GOMES et al.³², 2004).

Até a década de 70, nos dentes com necrose pulpar, as espécies microbianas eram isoladas do canal radicular empregando técnicas de cultura microbiológica predominantemente aeróbias. As técnicas limitavam o cultivo e identificação de microrganismos anaeróbios estritos (LEONARDO⁴⁸, 2005). Assim, a microbiota endodôntica de dentes sem vitalidade pulpar era considerada predominantemente aeróbia e facultativa (BROWN JR. e RUDOLPH⁹, 1957; SOCRANSKY et al.⁸⁹, 1959; WINKLER e VAN AMERONGEN¹⁰⁷, 1959). Durante a década de 70, com o surgimento de técnicas microbiológicas em anaerobiose, por meio do aprimoramento das técnicas de colheita e cultivo microbiano, os estudos começaram a demonstrar maior prevalência de microrganismos anaeróbios obrigatórios nas infecções endodônticas (FABRICIUS et al.²², 1982; SUNDQVIST^{97,99,96}, 1976, 1989, 1992; TRONSTAD et al.¹⁰¹, 1987). Esses achados determinaram um novo conceito filosófico no tratamento dos dentes com necrose pulpar, particularmente naqueles com lesão periapical crônica (LEONARDO⁴⁸, 2005).

Os resultados de pesquisas envolvendo a microbiota do canal radicular de dentes com necrose pulpar sem lesão periapical, evidenciam que os microrganismos encontram-se

na luz do canal radicular (LEONARDO⁴⁸, 2005). O canal radicular transforma-se em ambiente propício à proliferação microbiana, com presença de nutrientes e sub-produtos bacterianos. Nessas condições, os microrganismos proliferam-se distantes dos elementos de defesa do organismo, que estão concentrados na região periapical (ASSED et al.³, 1996). Com o passar do tempo, consumo de oxigênio e alterações metabólicas, ocorre uma mudança (*shift*) na microbiota endodôntica (SUNDQVIST⁹⁶, 1992). Essas alterações irão favorecer o crescimento de anaeróbios obrigatórios nos canais radiculares inicialmente infectados por aeróbios e facultativos. Fatores determinantes na modificação da microbiota endodôntica podem ser descritos como: alterações nos níveis de oxigênio, mudanças na cadeia alimentar e interações microbianas. Ainda como fator determinante, Bassler⁴, em 1999, relata um mecanismo observado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, denominado comunicação intergênica, ou *quorum-sensing*, no qual a expressão de certos genes determinaria a sobrevivência de alguns microrganismos, em função das modificações no meio.

Novos métodos altamente sensíveis, rápidos e específicos, têm sido propostos para a identificação de microrganismos, como as técnicas de biologia molecular (GONÇALVES e MOUTON³³, 1999, SIQUEIRA JR. et al.^{82,88}, 2005, 2002; XIA et al.¹¹⁰, 2000) que têm permitido à Endodontia a identificação de espécies bacterianas que até então não eram relatadas como parte da microbiota endodôntica. Dentre essas técnicas, destaca-se a denominada *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Esse método identifica microrganismos em amostras clínicas sem a necessidade de cultura ou de testes bioquímicos, além de permitir a detecção de microrganismos que são difíceis e até impossíveis de crescimento pelo método de cultura microbiológica (SOCRANSKY et al.⁹⁰, 1994; ASSED et al.³, 1996; MORAES et al.⁵⁶, 2002).

A identificação dos microrganismos por meio da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, é baseada em similaridades genômicas. O método consiste em cruzar um grande número de amostras de DNA com amostras específicas de DNA de microrganismos, posicionadas sobre um suporte de membrana, permitindo a detecção simultânea de várias espécies bacterianas em únicas ou múltiplas amostras. Além disso, a técnica não requer viabilidade bacteriana, pode detectar espécies em baixas proporções, não sendo necessária a amplificação do DNA para a identificação do microrganismo, como na técnica denominada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (SOCRANSKY et al.⁹⁰, 1994). Já entre as principais desvantagens dos métodos de cultura destacam-se: custo e dificuldades quando utilizados para avaliação de infecções polimicrobianas, como as infecções de canal radicular (MORSE⁵⁷, 1971; LOESCHE et al.⁵⁰, 1992).

Na Endodontia, estudos utilizando a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* têm evidenciado que lesões periapicais são infecções polimicrobianas e são predominantemente compostas por microrganismos Gram-negativos (VAFAIE et al.¹⁰², 1999; SOCRANSKY et al.⁹¹, 2004). Outros achados mostram que espécies anaeróbias não descritas anteriormente podem estar relacionadas às infecções periapicais, como *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), hoje, considerada uma das espécies bacterianas mais frequentes nos casos de dentes com lesão periapical (GATTI et al.²⁶, 2000; GONÇALVES e MOUTON³³, 1999; GONÇALVES et al.³⁴, 1999; SIQUEIRA JR. et al.^{79,73,85}, 2003, 2001, 2000; SUNDE et al.⁹⁵, 2000).

Com o objetivo de proporcionar maior embasamento para o tratamento de dentes com necrose pulpar, a proposta do presente estudo é avaliar a microbiota de dentes sem vitalidade pulpar com ou sem lesão periapical crônica visível radiograficamente por meio das técnicas de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e cultura microbiológica.

2 Revisão da literatura

Em 1894, Miller⁵² sugeriu a correlação direta entre a ocorrência de patologias pulpares e a presença de bactérias. Salientou ainda a importância desses conhecimentos na compreensão e tratamento das patologias dos tecidos periapicais.

Brown Jr. e Rudolph⁹, em 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 microrganismos em 90% dos casos, predominantemente espiroquetas. Por meio da técnica de cultura foi possível identificar: 51,3% de anaeróbios facultativos, 23,9% de anaeróbios obrigatórios e 23,9% de aeróbios nos canais radiculares infectados.

Socransky et al.⁸⁹, em 1959, cultivaram *Treponema microdentium* como colônias de superfície, obtendo sucesso após a exclusão do oxigênio atmosférico durante a manipulação do inóculo. Para tanto, manipularam todas as culturas em uma câmara fechada. Na câmara foi colocado um balão meteorológico insuflado, e subsequentemente, foi introduzido nitrogênio em seu interior. Todos os experimentos foram submetidos a concentrações mínimas de oxigênio (0,05% ou menos). Os meios e os materiais foram introduzidos na câmara por uma trava exterior. O meio foi suplementado por sangue de coelho ou de cavalo (10%) e ágar a 3%. Assim, desenvolveram a câmara de anaerobiose, aprimorando as

técnicas de transporte e cultura microbiológica, protegidas de oxigênio e dessa forma tornando possível o isolamento de bactérias anaeróbias.

Winkler e van Amerongen¹⁰⁷, em 1959, estudaram a microbiota presente em 4186 culturas de canais radiculares de dentes com e sem vitalidade pulpar. Foi realizada a anti-sepsia da cavidade bucal com a aplicação de tintura de iodo a 5%. Após a remoção da cárie, a anti-sepsia foi repetida. Instrumentos esterilizados foram usados para o acesso à câmara pulpar e ao canal radicular dos dentes. Solução salina foi utilizada como solução irrigadora. Para as culturas iniciais, uma ponta de papel absorvente foi colocada em contato com o conteúdo do canal radicular. Nos dentes tratados endodonticamente, exsudato periapical foi colhido via canal radicular. Após o preparo do canal radicular, uma nova ponta de papel absorvente foi introduzida no canal, até a região periapical, mantida em posição durante três minutos. As amostras colhidas foram então transferidas para placas contendo ágar e 5 ml de meio de cultura BHI (brain-heart infusion). As placas contendo ágar e o meio de cultura foram incubadas em aerobiose e anaerobiose (acrescentou-se meio Rogosa, pH 6.8). Observaram culturas negativas em 72% dos casos e positivas em 27%. *Streptococcus* spp. foi predominante (51% de culturas puras e 63% de todos os organismos), seguido de *Micrococcus* spp. (14%) e *Lactobacillus* spp. (8.5%). Em 903 casos, um microrganismo foi isolado enquanto que em 238 culturas (21%), havia mais de um microrganismo (infecção mista).

Em 1965, Kakehashi et al.⁴³ compararam as alterações resultantes de exposições pulpares 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 experimental, ocorreu necrose no tecido pulpar em presença de bactérias, resultando no desenvolvimento de lesões periapicais 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.

Já em 1967, Melville e Birch⁵¹ estudaram a microbiota dos canais radiculares e do tecido periapical de dentes sem vitalidade pulpar. Foram realizadas colheitas do interior dos canais radiculares e do tecido periapical de 104 incisivos, sendo 27 já tratados endodonticamente e com indicação de cirurgia parendodôntica. A colheita foi realizada por meio de uma técnica asséptica, em que o dente foi desinfectado com pedra pomes antes da colocação do lençol de borracha, e após a colocação, o lençol e o dente isolado foram desinfectados com tintura de iodo (25%), durante três minutos. O canal foi acessado com instrumentos esterilizados e a microbiota do canal foi colhida com pontas de papel esterilizadas. Foram realizadas apicectomias apenas de dentes anteriores e para obtenção da amostra bacteriológica da área periapical, 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 periapical, seria essencial tanto cultura aeróbia quanto anaeróbia e que, mesmo em presença de bactérias no canal radicular, a região periapical pode permanecer esterilizada. No entanto, geralmente a microbiota periapical é idêntica à microbiota presente no interior do canal radicular.

Em 1973, Berg e Nord⁶ utilizaram *in vivo* uma técnica especial de colheita para preservação de microrganismos anaeróbios em dentes infectados de humanos, utilizando uma mistura gasosa de 3% de hidrogênio em nitrogênio, aplicada sobre o campo operatório, obtendo assim uma maior quantidade de bactérias anaeróbias que as técnicas convencionais.

Kantz e Henry⁴⁴ (1974) colheram amostras de 24 dentes com necrose pulpar de humanos com câmaras pulpares fechadas de 20 pacientes. Para manter o ambiente de anaerobiose durante a colheita das amostras do interior dos canais radiculares, foi desenvolvida uma nova metodologia, assim como para o transporte e a identificação. Um fluxo constante de gás nitrogênio (2-3 l/min.) foi direcionado sobre as superfícies dos dentes enquanto o canal radicular era acessado. Meio RTF foi introduzido no canal radicular, instrumentou-se com limas tipo Hédstrom, e aproximadamente um milímetro do conteúdo do canal foi aspirado por meio de uma seringa esterilizada. Foram isolados 104 microrganismos anaeróbios, de um total de 377 microrganismos. Os mais comumente observados foram *Actinomyces israelii*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sputorum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium fusiformis*, *Fusobacterium varium*, *Peptococcus morbillorum*, *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula*.

Wittigow e Sabiston¹⁰⁸(1975) colheram amostras de tecido necrótico de dentes com câmara pulpar íntegra, em dentes que haviam sofrido traumatismos. Foi utilizada uma técnica que minimizava possibilidade de contaminação com a microbiota bucal. Uma profilaxia foi realizada com pedra pomes antes do isolamento absoluto. O lençol de borracha foi desinfetado com álcool 70% e tintura de iodo a 5%. O acesso à câmara pulpar e ao canal radicular foi feito com brocas esterilizadas. Pontas de papel esterilizadas foram introduzidas no canal para colher as amostras. Posteriormente, essas pontas foram

colocadas em tubos esterilizados contendo gás carbônico e solução salina. As amostras foram cultivadas em aerobiose e anaerobiose, em meios BHI (brain-heart infusion) e ágar sangue. Os microrganismos foram posteriormente identificados. Dos 42 dentes, 32 resultaram em culturas positivas. Bastonetes anaeróbios Gram-negativos foram observados. Entre as demais espécies identificadas podemos citar os cocos anaeróbios Gram-negativos e Gram-positivos, *Lactobacillus sp.* e *Streptococcus sp.*

Keudell et al.⁴⁵ (1976) analisaram o conteúdo microbiológico de 42 canais radiculares de dentes de humanos com necrose pulpar. As amostras foram colhidas sob fluxo de dióxido de carbono e hidrogênio, livre de oxigênio, direcionada ao redor da abertura coronária. Foi possível observar crescimento de microrganismos anaeróbios obrigatórios em 64% da amostra. A maioria dos anaeróbios isolados dos canais radiculares era Gram-positiva como *Actinomyces*, *Eubacterium alactolyticum*, *Propionibacterium*, e Gram-negativa, como *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*. Foram isolados ainda, cocos Gram-positivos como *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. micros* e *Peptococcus magnus* e cocos Gram-negativos como *Veillonella alcalescens* e *V. parvula*.

Sundqvist⁹⁷ (1976), em um estudo clássico, avaliou 32 dentes unirradiculados 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. Foram isoladas bactérias de 18 dos 19 dentes que apresentavam lesão periapical 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 microrganismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais. 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 *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Campylobacter*.

Zavistoski et al.¹¹¹ (1980) descreveram uma técnica quantitativa de cultura de espécies bacterianas endodônticas. As amostras foram colhidas 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 10 dentes sem vitalidade pulpar. Uma microbiota mista, com presença de aeróbios e anaeróbios, foi observada em 9 amostras, sendo encontradas em média cinco espécies diferentes de microrganismos por amostra. Por esses resultados, os autores reiteraram o conceito de que as bactérias desempenham um papel significativo no desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais.

Sundqvist e Reuterving⁹⁸ (1980) isolaram pela primeira vez *Actinomyces israelii* a partir de amostras de lesões periapicais, por meio de uma nova técnica microbiológica. Antes deste estudo, a espécie só havia sido isolada do interior de canais radiculares. Neste estudo, o dente selecionado foi tratado, removendo-se o material restaurador em condições assépticas e deixando curativo de demora, e os espécimes foram colhidos quatro dias após. As amostras foram colocadas em meio tioglicolato, adicionado a ágar. Um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio foi então colocado no canal. O dente foi acompanhado em intervalos de seis meses, e em cada ocasião, uma amostra do canal radicular foi colhida. A destruição periapical aumentou em tamanho durante o tratamento e optou-se por uma cirurgia periapical. Após a apicectomia, o canal foi obturado com gutapercha e selado com amálgama. Os autores diagnosticaram a infecção por *A. israelii* previamente ao tratamento cirúrgico, em um caso onde o tratamento endodôntico convencional não apresentou sucesso.

Dáhlen e Bergholtz¹⁸ (1980) estudaram a presença da endotoxina nos canais radiculares de 13 dentes com polpas necróticas com e sem lesão periapical. A presença da endotoxina está relacionada com a presença de bactérias Gram-negativas. Nove dos 13 dentes examinados estavam infectados, enquanto em 4 espécimes não foi observado crescimento bacteriano. Em sete dos nove canais radiculares infectados, o predomínio foi de bactérias anaeróbias Gram-negativas. A análise radiográfica mostrou que a área periapical dos dentes com canais infectados apresentavam áreas de reabsorção óssea, enquanto nos dentes em que não houve crescimento bacteriano não foi possível observar sinais de inflamação periapical radiograficamente. Nos canais radiculares contendo microrganismos Gram-negativos, o teste de Limulus foi em todos os casos positivo, demonstrando a presença da endotoxina na parede celular destes microrganismos, enquanto que nos canais sem crescimento bacteriano, ou onde havia crescimento apenas de Gram-positivos, o teste foi negativo. Os resultados demonstraram que a endotoxina está relacionada com a presença e com o número de microrganismos Gram-negativos presentes no interior dos canais radiculares.

Byström e Sundqvist¹² (1981) avaliaram a presença bacteriana em 15 dentes unirradiculados portadores de polpas necróticas e lesões periapicais, durante todos os tratamentos endodônticos. Foi observada a eficácia da instrumentação manual utilizando como solução irrigadora apenas o soro fisiológico. Após a realização do preparo biomecânico, 47% da amostra ainda apresentava crescimento bacteriano. Microrganismos anaeróbios estritos representavam 88% dos microrganismos detectados no interior dos canais radiculares, e as espécies mais comumente isoladas foram *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum* e *Prevotella intermedia*.

Möller et al.⁵⁴ (1981), após exposição ao ambiente bucal do tecido pulpar de dentes de macacos, realizaram o selamento coronário e examinaram esses dentes após seis meses. Amostras microbiológicas foram colhidas do canal radicular dos dentes de macacos em períodos de 7, 90 e 180 dias. O exame microscópico de todas as amostras foi realizado por microscopia a fresco (contraste/fase) e por coloração de Gram. Todas as polpas expostas se tornaram infectadas com microrganismos como *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Enterococcus*, coliformes e anaeróbios como os bacteróides, eubactéria, propionibactéria e *Peptostreptococcus*. 90% dos dentes desenvolveram lesões periapicais visíveis radiograficamente.

Fabricius et al.²² (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. Colheitas microbiológicas foram feitas 7, 90, 180 e 1060 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, de acordo com os resultados das amostras. *Bacteroides melaninogenicus*, agora denominado *Prevotella melaninogenicus* foi encontrado em alto percentual na região periapical. *Prevotella* e *Porphyromonas* têm se mostrado capazes de induzir abscessos em uma variedade de culturas puras tanto quanto em associação com outros microrganismos facultativos.

Haapasalo e Orstavik³⁵ (1983) realizaram exame bacteriológico em dois casos de infecções periapicais persistentes. Os dois casos não haviam respondido ao tratamento endodôntico convencional associado à administração sistêmica de penicilina e eritromicina. O cultivo das amostras foi realizado imediatamente após a colheita do material do interior

dos canais radiculares. No primeiro caso, foi isolado *Enterobacter cloace*, e no segundo *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus spp.* Não foram detectados anaeróbios obrigatórios. O tratamento endodôntico obteve sucesso após a administração de medicamentos baseados na susceptibilidade antibiótica dos microrganismos isolados.

Nair⁵⁹ (1987) em um estudo de microscopia eletrônica de varredura de 31 lesões periapicais de humanos (30 granulomas e 1 cisto periapical) observou que todas as superfícies radiculares estavam infectadas por cocos, bacilos, microrganismos filamentosos e espiroquetas. Na maioria dos casos, a microbiota estava restrita ao sistema de canais radiculares. No entanto, bactérias intra e extracelulares puderam ser observadas em quatro granulomas e no cisto radicular.

Trönstad et al.¹⁰¹ (1987) estudaram a presença de bactérias em oito dentes com lesões periapicais assintomáticas e refratárias ao tratamento endodôntico convencional. Durante a realização de cirurgia pararendodôntica, foram colhidas amostras de tecido das lesões periapicais e cortes superficiais dos ápices radiculares. Foi realizada a metodologia de cultura em anaerobiose e o crescimento bacteriano pôde ser evidenciado em todas as lesões analisadas. Duas delas apresentaram bactérias anaeróbias e cinco estavam intensamente colonizadas por anaeróbios. Foram detectadas espécies de *Bacteroides* pigmentados de negro, assim como bacilos anaeróbios Gram-positivos e cocos. Espécies de estreptococos facultativos foram raramente isoladas.

Fukushima et al.²⁵ (1990) avaliaram microbiologicamente 21 dentes humanos extraídos com lesão periapical 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 periapicais assintomáticas. Dos 21 dentes observados, 13 apresentaram culturas positivas, sendo 11 mistas e 2 puras.

Anaeróbios obrigatórios foram obtidos em 20 casos e anaeróbios facultativos em 8. Topograficamente, os microrganismos 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.

Ando e Hoshino² (1990) estudaram a presença e os tipos de bactérias invasoras de camadas profundas de dentina (0.5 – 2.0 mm) da parede de canais radiculares infectados de dentes humanos recém-extraídos. Amostras foram colhidas em oito dentes com destruição de parte da coroa por cárie. Após a exodontia de cada dente, o ápice radicular e a cavidade coronária foram selados e os dentes foram colocados sob uma mistura de gás nitrogênio e gás carbônico na concentração de 5%. Os dentes foram desinfetados com iodo e transferidos para uma caixa em ambiente de anaerobiose contendo 80% de nitrogênio, 10% de hidrogênio e 10% de gás carbônico. Na caixa, as amostras da dentina do canal radicular foram colhidas e pesadas. A seguir, as amostras foram colocadas em placas contendo ágar e meio BHI, e incubadas em anaerobiose. Foram encontradas bactérias anaeróbias obrigatórias em 80% da amostra, em maior quantidade os gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Nas camadas mais profundas de dentina não foram detectadas cepas de bacilos anaeróbios Gram-negativos.

Nair et al.⁶⁰ (1990) analisaram com microscopia de luz e eletrônica, nove lesões periapicais assintomáticas, removidas como blocos de biópsias durante o tratamento cirúrgico dos dentes afetados. Seis, das nove biópsias revelaram a presença de microrganismos na região apical do canal radicular. Quatro continham uma ou mais espécies de bactérias e duas apresentavam leveduras. Dos três casos onde nenhum

microrganismo pôde ser observado, um apresentou características histopatológicas de um granuloma de células gigantes. Estes achados sugerem que na maior parte dos dentes humanos tratados endodonticamente com lesões periapicais resistentes à terapia não-cirúrgica, os microrganismos apresentam um papel significante nas falhas endodônticas.

Baumgartner e Falkler⁵ (1991) investigaram a presença bacteriana nos cinco mm apicais de canais radiculares infectados. Os dentes utilizados na amostra apresentavam as polpas expostas e lesões periapicais 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 50 cepas bacterianas, dos 10 canais radiculares que fizeram parte da amostra. Do total de microrganismos isolados, 68% eram anaeróbios obrigatórios. O estudo demonstrou a presença predominante de anaeróbios nos cinco mm apicais dos canais radiculares de dentes com exposições pulpares decorrentes de cárie e lesões periapicais.

Hashioka et al.³⁸ (1992) avaliaram a relação entre os sintomas clínicos e a presença de bactérias anaeróbias em canais radiculares infectados. Foram avaliados microbiologicamente 28 dentes de 25 pacientes com periodontite apical. Os resultados demonstraram a presença freqüente de *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* nos casos com dor espontânea e à percussão; *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Bacteroides* nos casos com dor à percussão, odor, exsudato e aumento de volume. *P. gingivalis* e *P. endodontalis* foram freqüentemente encontrados nos casos com dor à percussão, odor e presença de exsudato, indicando uma correlação positiva entre *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e

Bacteroides isolados de canais radiculares infectados e dor à percussão, assim como entre *Porphyromonas* e *Bacteroides* e a presença de odor no interior dos canais radiculares.

Wayman et al.¹⁰⁶ (1992) avaliaram 58 lesões periapicais através da histopatologia e de cultura microbiológica. Metade das lesões tinha comunicação com a cavidade bucal. Uma porção da biópsia foi submetida ao exame histopatológico e outra à cultura. As culturas bacterianas foram positivas em 51 dos 58 casos, e bactérias foram observadas em 8 dos 58 casos. Foram isoladas 50 espécies bacterianas diferentes, sendo a maior parte, anaeróbios obrigatórios.

Sundqvist⁹⁶ (1992) investigou a existência de relações comensais ou antagonistas entre microrganismos nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Foram colhidas amostras de 65 canais radiculares de dentes de humanos e estas analisadas microbiologicamente. As espécies mais frequentemente encontradas foram *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium 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.

Wasfy et al.¹⁰⁵ (1992) estudaram a microbiota de dentes com história de trauma em 85 pacientes. Não havia, em nenhum caso, presença de lesão de cárie ou doença periodontal. A média de espécies bacterianas encontradas por amostra foi de 3,1. A microbiota observada era predominantemente anaeróbia, sendo 73% das bactérias cultiváveis. Os microrganismos mais frequentemente isolados foram *Eubacterium* (68%), *Streptococcus morbillorum* (47%), e *bacteroides* não pigmentados.

Gomes et al.²⁷ (1994) estudaram a associação de bactérias específicas com alguns sinais endodônticos e sintomas clínicos. Para isso, foi feito o exame microbiológico de 30 canais radiculares de pacientes que buscavam tratamento endodôntico; destes 14 relacionados com sintomatologia dolorosa, 20 com sensibilidade à percussão, 23 com presença de exsudato, 7 relacionados à edema, 5 com exsudato purulento e 4 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 microrganismos anaeróbios foram isolados em 93% dos canais. Nos casos que não estavam relacionados com dor, a presença de microrganismos anaeróbios foi de apenas 53%. Os autores afirmaram que existe uma associação significativa entre dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* sp. nos canais radiculares.

Socransky et al.⁹⁰ (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 consiste na desnaturação de DNA de até 43 amostras, dispostas em faixas horizontais. A membrana é girada a 90° no mesmo aparelho, e em 43 faixas verticais são vertidas sondas de DNA com marcadores. Onde houver recombinação gênica do DNA, nas interseções amostra/sonda, evidencia a presença de determinada espécie. A técnica permite a determinação simultânea da presença de múltiplas amostras, realizando-se um único exame.

Assed et al.³ (1996) avaliaram a presença de *Actinomyces viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* em materiais colhidos do interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica e com presença de lesão

periapical visível radiograficamente. Para isso, após a colheita 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.²⁹ (1996) procuraram avaliar se uma determinada combinação de bactérias específicas está associada com sinais e sintomas endodônticos. O método utilizado pelos autores foi semelhante ao estudo de 1994²⁸. Foi realizado o estudo microbiológico de 70 canais radiculares, onde o material colhido 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 microrganismos anaeróbios obrigatórios totalizaram 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.

Também em 1996, Gomes et al.³¹ estudaram as variações na susceptibilidade de componentes da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Amostras microbiológicas foram colhidas de 42 canais radiculares, sendo que foram divididos em 2 grupos: grupo 1 que apresentava dentes sem tratamento endodôntico anterior e grupo 2 que já havia sido submetido a tratamento endodôntico prévio. Amostras colhidas antes e após a instrumentação e os achados bacterianos foram comparados. Houve uma significativa diminuição entre a primeira e a segunda colheita 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.

Vigil et al.¹⁰³ (1997) realizaram diagnóstico histológico e cultura microbiológica de 28 amostras colhidas do periápice radicular de casos resistentes ao tratamento endodôntico, e com indicação de cirurgia parendodôntica. Foram isoladas e identificadas bactérias destas lesões, além de testada sua susceptibilidade aos antibióticos mais comumente utilizados. Vinte e duas, das 28 lesões (79%), continham microrganismos. Dos 22 casos que exibiam culturas positivas, 15 eram polimicrobianas e 7 resultaram em culturas puras. Um total de 53 espécies diferentes foram isoladas, sendo 29 anaeróbios obrigatórios, 19 anaeróbios facultativos e 5 aeróbios. Em apenas um caso foi possível observar microrganismos por meio da microscopia óptica. Os microrganismos mais comumente isolados foram *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, *Wollinella recta*, *Fusobacterium* e *Clostridium*. Os testes de sensibilidade aos antibióticos não demonstraram resistência das espécies avaliadas. Estes resultados corroboraram com estudos anteriores a respeito da população microbiana das lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico convencional.

A sensibilidade a antibióticos da microbiota de canais com polpas necrosadas foi avaliada por Le Goff et al.⁴⁷ (1997). Foram utilizados na amostra 26 dentes unirradiculados, com polpas necrosadas, cujas coroas e raízes apresentavam-se intactas. No total, 84 cepas foram isoladas. O número de espécies por dente variou de 2 a 8, com predomínio de anaeróbios obrigatórios. Foi avaliada a sensibilidade de 38 cepas à amoxicilina, à amoxicilina associada ao clavulonato, e à tetraciclina. Para todas as cepas examinadas, as concentrações inibitórias mínimas encontradas foram baixas, e bem menores que a concentração plasmática efetiva para esses antibióticos.

Em 1997, Waltimo et al.¹⁰⁴ isolaram fungos do interior de 19 canais radiculares de dentes que apresentavam lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico. Em 16 amostras foi isolada *Candida albicans*. Em grande parte da amostra, bactérias Gram-positivas facultativas estavam associadas aos fungos, e em 5 casos, havia também a presença de anaeróbios obrigatórios.

Provado que lesões periapicais não são estéreis e que podem estar contaminadas por microrganismos oportunistas associados, devido à comunicação com o meio bucal ou um grupo restrito de anaeróbios facultativos, Abou-Rass e Bogen¹ (1998) se propuseram a identificar quais os microrganismos associados com lesões periapicais fechadas, associadas com terapia endodôntica sem sucesso, e com calcificação pulpar. Em todos os 13 casos examinados, as amostras retiradas do ápice abrigavam microrganismos sendo 63,6% anaeróbios obrigatórios e 36,4% facultativos. Os resultados indicaram que as lesões periapicais fechadas, associadas a canais radiculares calcificados, ou a insucessos no tratamento endodôntico abrigam microrganismos. A inabilidade em erradicar todos os microrganismos do canal radicular durante o tratamento do sistema de canais radiculares, pode permitir a colonização bacteriana adicional do ápice radicular e dos tecidos periapicais, conseqüentemente promovendo o desenvolvimento da lesão periapical e evitando o reparo da região.

Molander et al.⁵³ (1998) avaliaram a microbiota de dentes com tratamento endodôntico, sendo 100 deles associados à lesão periapical e 20 sem evidência de lesão periapical. Todos os casos haviam sido tratados endodonticamente há mais de quatro anos, caracterizando casos de insucesso, no entanto, sem apresentar sintomas clínicos indicativos de periodontite apical aguda. Na maior parte dos casos associados à lesão periapical, 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 periapical, em 11 casos não houve crescimento bacteriano. Nas nove amostras restantes, houve crescimento de 13 espécies bacterianas.

Bogen e Slots⁷ (1999) realizaram um estudo para determinar a frequência de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em 20 lesões periapicais fechadas associadas com patologias endodônticas refratárias, sintomáticas e assintomáticas. Anteriormente à cirurgia parendodôntica, foram colhidas amostras de outros três sítios bucais para análise microbiológica. As amostras da região periapical foram colhidas com pontas de papel absorvente, durante os procedimentos cirúrgicos parendodônticos utilizando-se um método onde o risco de contaminação por microrganismos 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 periapicais fechadas.

Gonçalves e Mouton³³ (1999) avaliaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* em canais radiculares com polpas necróticas e presença de lesão periapical 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 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.

Gonçalves et al.³⁴ (1999) colheram amostras de canais radiculares infectados e de biofilme bacteriano subgingival de 10 pacientes sem lesões de cáries ou restaurações profundas. As amostras foram submetidas à cultura em anaerobiose para detecção de anaeróbios pigmentados de negro. A técnica PCR com *primer* arbitrário foi realizada para examinar a diversidade genética dos microrganismos isolados. De acordo com os resultados observados pelos autores, os tecidos periodontais e os canais radiculares podem ser colonizados pelos mesmos tipos clonais de anaeróbios pigmentados de negro.

Siqueira et al.⁸⁵ (2000) examinaram o conteúdo de 28 canais radiculares utilizando 42 sondas de DNA e *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Para confirmar a presença de DNA bacteriano nas amostras, foi realizado um teste PCR com *primers* comuns a maioria das espécies bacterianas. Ao teste *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, 22 das 42 sondas utilizadas foram reativas com 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 *Bacteroides forsythus*, *Haemophilus aphrophilus*, *Corynebacterium matruchoti*, *Porphyromonas 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.

Sunde et al.⁹⁵ (2000) realizaram um estudo a fim de identificar as bactérias presentes em lesões periapicais de dentes que não apresentavam sintomatologia dolorosa. Foram selecionados para a amostra 34 dentes com canais radiculares endodonticamente tratados, portadores de lesões periapicais. A amostra foi dividida em dois grupos, de acordo com a incisão utilizada para exposição da lesão periapical: incisão marginal ou submarginal. As

lesões foram removidas com o auxílio de curetas esterilizadas, e levadas a um recipiente contendo meio de transporte (PRAS). Foi realizada a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, utilizando 40 sondas de DNA completo. Nos casos onde foi realizada incisão marginal, o número de espécies bacterianas evidenciadas foi maior, sugerindo que nestes casos, bactérias que colonizam primariamente os tecidos periodontais, podem de forma iatrogênica, alcançar os tecidos periapicais subjacentes.

Ribeiro e Consolaro⁶⁵ (2000), com o método de coloração Brown & Brenn, procuraram evidenciar bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma periapical. Os autores relataram maiores concentrações de bactérias nos canais principais e acessórios, seguidos dos túbulos dentinários, cimento e granulomas. Os autores destacaram a presença de biofilme na região apical de todos os elementos dentários.

Jung et al.⁴¹ (2001) procuraram identificar espécies de espiroquetas originárias de infecções endodônticas e determinar sua associação com *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis* em dentes portadores de lesão periapical visível radiograficamente. Para isso, foram colhidas 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 8 sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas. Como espécie mais freqüente foi detectada *P. gingivalis* seguida de *Treponema maltophilum*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema socranskii*. Foram observadas associações entre *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*.

Siqueira e Lopes⁷⁴ (2001) examinaram a presença de bactérias na superfície radicular apical de dentes não tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas. Foram extraídos 27 dentes de humanos com extensas lesões de cárie e lesões periapicais 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 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.⁶⁸ (2001) procuraram determinar a existência de associação entre os microrganismos *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, conhecidos patógenos periodontais. Por meio da biologia molecular foram estudados 50 canais radiculares de dentes sem vitalidade pulpar e com lesão periapical. O DNA das amostras foi extraído e examinado por PCR. Em 33 casos foi encontrado pelo menos um dos microrganismos estudados. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* foram detectados em 44%, 30% e 20% dos casos respectivamente. Os três microrganismos foram identificados em conjunto em 4 casos.

Lana et al.⁴⁶ (2001) avaliaram a microbiota de 31 canais radiculares de pacientes com polpas necrosadas. Em 22 casos a coroa dentária estava fechada, e em 9 já havia comunicação da câmara pulpar com a cavidade bucal. Foram realizadas três colheitas 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 colheita 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, 5 e 2 amostras clínicas iniciais respectivamente. Na segunda colheita, mesmo após a instrumentação e o uso de um

curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, microrganismos facultativos foram isolados em 2 canais radiculares, e fungos em 3. Na terceira colheita, foram isolados microrganismos de 7 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 microrganismos mesmo após o tratamento endodôntico.

Ainda em 2001, Siqueira et al.⁸⁶ examinaram a microbiota de abscessos perirradiculares agudos de origem endodôntica utilizando a biologia molecular. Exsudato purulento foi aspirado de 27 casos de abscessos endodônticos, o DNA foi extraído e a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi realizada. 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 com uma ou mais amostras. O número de espécies bacterianas nas amostras de exsudato purulento variou de 1 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.

Leonardo et al.⁴⁹ (2002) avaliaram a presença de biofilme bacteriano na superfície externa de ápices radiculares de dentes com polpa necrosada, com e sem lesão periapical visível radiograficamente, e em dentes com vitalidade pulpar. Vinte e um dentes foram extraídos, 8 com necrose pulpar e lesão periapical, 8 com necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente, e 5 com vitalidade pulpar. A avaliação foi feita por meio de microscópio eletrônico de varredura. Microrganismos foram encontrados em 100% dos dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, incluindo cocos, bacilos e filamentosos bem como a presença de um biofilme apical.

Moraes et al.⁵⁶ (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 *Fusobacterium nucleatum* em 36 dentes com canais radiculares infectados e presença de lesão periapical. Somando os resultados dos três métodos, a espécie *F. nucleatum* estava presente em 4 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.

Peters et al.⁶³ (2002) avaliaram as bactérias encontradas em infecções endodônticas de dentes portadores de lesões periapicais crônicas sem sintomatologia ou sinais clínicos. Amostras do conteúdo de 58 canais radiculares foram cultivadas em anaerobiose, e os microrganismos contados e classificados. Todas as amostras apresentaram crescimento bacteriano. Microrganismos anaeróbios obrigatórios representaram 87% de toda a amostra. A espécie bacteriana mais prevalente foi *Prevotella intermedia*, presente em 33% dos canais radiculares analisados, *Peptostreptococcus micros*, em 29% dos canais, e *Actinomyces odontolyticus*, em 19%. De acordo com os resultados observados, os autores concluíram que os patógenos responsáveis por patologias endodônticas não infectam os canais radiculares de forma randômica, mas são encontrados em combinações específicas.

Siqueira et al.⁸⁸ (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. O método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* 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.

Chávez de Paz et al.¹⁵, em 2003, estudaram 200 canais radiculares que estavam em tratamento endodôntico. Analisaram se havia ou não microrganismos cultiváveis em amostras de canais radiculares colhidas um dia após a primeira sessão do tratamento ter sido iniciada. Durante a primeira sessão foi colocado um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Um total de 248 tipos de microrganismos foi isolado de 107 dentes. Houve o predomínio de gram-positivos (85%). *Lactobacillus* spp. (22%) e *Enterococcus* spp. (12%) foram as espécies mais comumente isoladas. Esses autores concluíram que, uma vez estabelecidas, essas espécies parecem sobreviver normalmente após o preparo químico-mecânico ter sido realizado.

Jacinto et al.³⁹ (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 colhidas de 48 canais radiculares, 29 sintomáticos e 19 assintomáticos. Os dentes sintomáticos apresentaram um maior número de anaeróbios obrigatórios nos canais radiculares e um maior número de espécies bacterianas. Mais de 70% das bactérias isoladas foram anaeróbios obrigatórios. Relações foram estabelecidas entre alguns microrganismos 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 *Prevotella intermedia/nigrescens* contra a Penicilina G.

Buscando identificar os microrganismos associados a canais radiculares com abscessos periapicais, Sousa et al.⁹² (2003) colheram amostras de 30 canais radiculares, utilizando pontas de papel absorvente esterilizadas. Do total de 117 tipos diferentes de bactérias encontradas, 75 eram anaeróbios obrigatórios. Os anaeróbios obrigatórios mais frequentemente isolados foram: *P. prevotti*, *Peptostreptococcus 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 periapical.

Souza⁹³ (2003) avaliou a prevalência de 51 espécies bacterianas em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica pela técnica de biologia molecular *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, além de observar a capacidade do hidróxido de cálcio em eliminar estes microrganismos. Previamente ao tratamento endodôntico, foram realizadas colheitas do material do interior dos 12 canais radiculares, incluídos na amostra, e novamente, no momento da obturação dos canais, após 14 dias de medicação intracanal. Os resultados demonstraram a presença de microrganismos em todas as amostras, com a prevalência de *Fusobacterium nucleatum ss. Vincentii* (100%), *Capnocytophaga sputigena* (90%), *Streptococcus constelatus* (80%), *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella melaninogenica* (75%), com uma redução significativa na prevalência e nos níveis de detecção nas amostras pós-terapia endodôntica.

A prevalência de *Treponema socranskii* em infecções endodônticas foi estudada por Siqueira Jr. e Rôças⁷⁵ (2003) por meio do *nested PCR*. As amostras foram colhidas de 60 canais radiculares com necrose pulpar e diferentes patologias periapicais. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado por meio de iniciadores 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%), 5 dos 12 canais radiculares associados com periodontite apical aguda (41,7%), e 5 dos 20 casos diagnosticados como abscesso periapical agudo (25%). Não foi possível observar relação entre a presença de *T. socranskii* e a ocorrência de sintomatologia. Em geral, este microrganismo foi detectado em 21 das 60 amostras (35%).

Rôças et al.⁶⁷ (2003) avaliaram a presença de espécies de *Treponema* em infecções endodônticas primárias usando o *nested PCR*. As amostras foram colhidas de 32 canais radiculares. Vinte e dois casos apresentavam lesões periapicais crônicas assintomáticas, e 10 casos assintomáticos foram diagnosticados como periodontite apical aguda. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado usando iniciadores 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 microrganismos, eles devem ser reconhecidos como supostos patógenos endodônticos.

Siqueira Jr. et al.⁸³ (2003) realizaram um estudo a fim de detectar, por meio do método de PCR, a espécie *Peptostreptococcus micros* em infecções endodônticas primárias. As amostras foram colhidas de 50 casos de lesões periapicais crônicas assintomáticas, periodontite apical aguda e abscesso periapical agudo. O DNA extraído das amostras foi amplificado utilizando o ensaio PCR, reproduzindo um fragmento do *P. micros* 16S rDNA. *P. micros* foi detectado em 6 dos 22 canais radiculares associados a lesões periapicais assintomáticas (27,3%), em 2 dos 8 canais radiculares com periodontite apical aguda (25%), e em 6 dos 20 casos de abscesso periapical 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 o *P. micros* pode estar envolvido na patogênese de diferentes formas de lesões periapicais.

Siqueira Jr. e Rôças⁷⁶ (2003) estudaram a ocorrência de *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus* em infecções endodônticas primárias pelo método de PCR. As amostras foram colhidas de 57 canais radiculares com necrose pulpar e evidência de reação periapical. Foram incluídos na amostra: 28 casos de lesão periapical crônica, 12 casos de periodontite apical aguda e 17 casos de abscesso periapical 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 periapicais assintomáticas, respectivamente. *Campylobacter gracilis* foi encontrado em 16,7% (2 de 12) dos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, enquanto *Campylobacter rectus* em 33,3% (2 de seis casos). Nos abscessos periapicais 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 Rôças⁷⁸ (2003) utilizaram o método de PCR para avaliar a ocorrência da espécie *Pseudoramibacter alactolyticus* em canais radiculares infectados associados a lesões periapicais assintomáticas ou pericementite apical e em amostras de pus colhidas de abscessos periapicais agudos. O DNA foi extraído das amostras e inicialmente amplificado utilizando iniciadores 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 periapicais crônicas, em 60% das amostras dos canais radiculares associados a pericementite apical aguda, e em 32% das amostras de pus aspiradas dos abscessos periapicais agudos. Não foi determinada associação significativa da espécie aos sintomas clínicos. Em geral, *P. alactolyticus* foi observada em 56% das amostras.

Siqueira Jr. e Rôças⁷⁵ (2003) estudaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* em infecções endodônticas primárias usando o *Nested PCR*. As amostras foram colhidas de 50 canais radiculares com diferentes formas de reação periapical. 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 *Bacteroides forsythus*. Foi possível identificar *Bacteroides 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 periapical agudo (50%). Não foi possível observar relação entre a presença de

Bacteroides 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 *Bacteroides forsythus* com infecções de origem endodôntica, e sugerem que a espécie pode estar envolvida na patogênese das diferentes formas de lesões periapicais.

Quando avaliaram a presença de fungos em infecções endodônticas, Siqueira Jr. e Sen⁸⁰ (2004) revisaram estudos que provaram a sua ocorrência através de métodos de cultura, biologia molecular e microscopia eletrônica. Os fungos possuem a capacidade de se adaptar a uma variedade de condições ambientais, de se aderir a diferentes superfícies, de produzir enzimas hidrolíticas, formar biofilme e modular reações imunes do hospedeiro, que podem ter um papel significativo na patogenia das doenças periapicais. Os fungos têm sido também observados em infecções endodônticas primárias, mas têm sido isolados com maior frequência em casos de canais radiculares já tratados endodonticamente, quando há insucesso no tratamento. Esses estudos mostraram que alguns medicamentos como: digluconato de clorexidina, hidróxido de cálcio, combinações destes, e EDTA, têm potencial para serem utilizados como curativo de demora em pacientes com suspeita de infecções endodônticas por fungos.

Rôças et al.⁶⁶ (2004) estudaram a associação da espécie *Enterococcus faecalis* com diferentes formas de doenças periapicais. Esta espécie é ocasionalmente isolada de casos de infecção endodôntica primária, mas é frequentemente encontrada em falhas de tratamento endodôntico. As amostras foram colhidas de canais radiculares não tratados endodonticamente, associados com lesões periapicais crônicas assintomáticas, pericementite apical aguda ou abscesso periapical agudo; e de canais radiculares já tratados endodonticamente, associados a lesões periapicais 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 periapical 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 frequências 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.⁹¹ (2004), por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, estudaram complexos ecossistemas microbianos. Avaliaram 8887 amostras de placa subgengival 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 provas de DNA utilizadas provaram ser uma ferramenta útil para enumerar espécies bacterianas em complexos ecossistemas microbiológicos.

Siqueira et al.⁸² (2005) compararam a prevalência de sete patógenos endodônticos em amostras de infecções endodônticas primárias colhidas 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.

Em 2005, Souza et al.⁹⁴ avaliaram a terapia endodôntica associada ao hidróxido de cálcio como curativo de demora através da avaliação microbiológica pela técnica de

Checkerboard DNA-DNA Hybridization. Para tanto, utilizaram 12 dentes unirradiculados com necrose pulpar e lesão periapical. Amostras foram colhidas do interior dos canais radiculares no início e 14 dias após o tratamento e a presença de 44 espécies bacterianas foi determinada pelo método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Diferenças significativas na microbiota entre o início e após a terapia endodôntica foram encontradas. As espécies prevalentes foram *F. nucleatum ss. Vincenti*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *S. constellatus*, *V. parvula*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica*, e *S. sanguis*. A frequência da maioria dos microrganismos foi reduzida após o tratamento. Esses resultados indicaram que a terapia endodôntica convencional com hidróxido de cálcio resultou na redução de espécies patogênicas associadas à necrose pulpar. No entanto, sua eficácia é limitada, já que não eliminou completamente todos os tipos de microrganismos.

Ferrari et al.²³ (2005) estudaram o efeito de procedimentos endodônticos sobre enterococos e fungos em infecções endodônticas primárias. Vinte e cinco dentes unirradiculados com polpas necróticas, intactas e lesões periapicais foram selecionados. Amostras foram colhidas dos canais antes e após a instrumentação. Microrganismos isolados foram identificados por testes bioquímicos. Enterococos e fungos estavam presentes em infecções endodônticas primárias. Particularmente, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foram resistentes ao preparo do canal radicular complementado pelo curativo de demora.

Foschi et al.²⁴ (2005) estudaram a presença de certas bactérias como *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema 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. Os autores sugeriram que essas espécies desempenham papéis críticos na patologia endodôntica.

Siqueira e Rôças⁷⁷ (2005) discutiram a aplicação de métodos moleculares em pesquisas da microbiologia endodôntica para uma caracterização mais completa da microbiota associada com diferentes tipos de infecções endodônticas. Embora seja recente sua introdução na pesquisa endodôntica, os métodos moleculares já têm contribuído significativamente para o entendimento dessas infecções na Endodontia. Os métodos moleculares têm 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, incultiváveis, que até então não tinham sido encontradas nas infecções endodônticas.

Em 2006, Jacinto et al.⁴⁰ estudaram a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em canais radiculares de dentes com abscesso periapical 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 clavulonato, azitromicina, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina. Um total de 352 tipos de microrganismos foi encontrado, pertencente a 69 espécies diferentes. Oitenta e três por cento dos microrganismos eram anaeróbios obrigatórios e 47,5% das bactérias isoladas eram Gram-negativas. *Porphyromonas gingivalis* foi encontrado em 20 canais radiculares e mais frequentemente em casos sintomáticos. Todos dessa espécie, *P.gingivalis*, foram sensíveis a: amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulonato, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, metronidazol e tetraciclina. Um tipo foi resistente a eritromicina e oito foram resistentes a azitromicina. Os autores concluíram que o patógeno *Porphyromonas gingivalis* é isolado com frequência de canais radiculares de dentes com abscessos periapicais. Amoxicilina, assim como amoxicilina associada ao ácido clavulânico e benzilpenicilina foram efetivas contra *P. gingivalis*.

Sakamoto et al.⁶⁹ (2006) estudaram a diversidade na composição da microbiota relacionada com infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas. Amostras foram colhidas de infecções endodônticas assintomáticas associadas a lesões periapicais crônicas e de infecções clinicamente sintomáticas diagnosticadas como abscessos agudos. Os

resultados revelaram que as seguintes espécies foram as mais comumente encontradas: *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus 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.

Em 2006, Sedgley et al.⁷⁰ examinaram a presença de *Enterococcus faecalis* em amostras de vários sítios da cavidade bucal de pacientes com necessidade de tratamento endodôntico. Amostras foram colhidas 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 colhido de 41 pacientes. Amostras provenientes da língua e da cavidade bucal (bochecho) foram colhidas 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* aparece 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.⁷¹ (2006) propuseram detectar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *Prevotella 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 colhidas assepticamente de 40 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 foram encontradas 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.

3 Proposição

O presente estudo teve como objetivo:

- Avaliar a microbiota endodôntica de dentes de humanos sem vitalidade pulpar com ou sem lesão periapical visível radiograficamente por meio das técnicas de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e cultura microbiológica.

4 Material e Método

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara, tendo sido aprovado em Reunião de 13/12/2004, de acordo com o Ofício CEP-FO/CAR. n° 77/2004 (Anexo A2).

Seleção dos pacientes

Os pacientes foram selecionados nas clínicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, dentre aqueles que apresentavam necessidade de realização de tratamento endodôntico. A anamnese foi realizada para cada paciente. Foram considerados fatores de exclusão para o estudo: pacientes submetidos à antibioticoterapia nos últimos três meses, dentes com impossibilidade de isolamento com lençol de borracha, com presença de sintomatologia, com comunicação direta entre a câmara pulpar com o meio bucal e dentes com doença periodontal ou com história de traumatismo. Foram utilizados apenas dentes unirradiculados com diâmetro mínimo equivalente a uma lima tipo Kerr n° 20 até 2 mm do ápice radicular. Após esclarecimento sobre o estudo, todos os pacientes assinaram um termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A3).

Os seguintes critérios foram anotados para cada paciente: idade, gênero, dente, condição pulpar, sensibilidade à percussão, mobilidade e presença de fístula. Foram selecionados dentes com ausência de vitalidade pulpar após terem sido feitos testes de sensibilidade pulpar ao frio e ao calor e teste de cavidade. Ao final foram escolhidos 18 pacientes, sendo a amostra total composta por 20 dentes unirradiculados. A avaliação radiográfica foi realizada por 2 examinadores experientes para identificar a presença ou

ausência de lesão periapical, e assim a divisão das amostras em grupos. O Grupo I foi formado por 10 dentes que apresentavam necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente, cujo tratamento didaticamente denomina-se Necropulpectomia I; e o Grupo II foi composto por 10 dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, cujo tratamento denomina-se Necropulpectomia II.

As radiografias foram obtidas por meio de um aparelho de raios-x odontológico, modelo Heliodent, com 60 KVp, 10 mA e com tempo de exposição de 0,4 segundo. Para cada tomada radiográfica foi utilizada uma película periapical Insight (Eastman Kodak Company – Rochester – NY – USA) acoplada a um posicionador radiográfico. As radiografias foram reveladas pelo método tempo/temperatura e arquivadas em cartelas de plástico.

Procedimentos da Colheita

Após a anti-sepsia da cavidade bucal com 10,0 ml de solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (Farmácia Experimental da Faculdade de Farmácia de Araraquara – UNESP), sob a forma de bochecho por 1 minuto, foi realizada anestesia e colocação de lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP) para o isolamento absoluto. A desinfecção do lençol de borracha e do dente foi realizada com solução de digluconato de clorexidina a 2% (Farmácia Experimental da Faculdade de Farmácia de Araraquara – UNESP) e neutralizada com soro fisiológico. O acesso à câmara pulpar e ao canal radicular foi realizado com assepsia, utilizando-se pontas diamantadas esféricas esterilizadas (KG Sorensen – Indústria e Comércio – São Paulo, SP) em alta rotação, sem refrigeração com água, sendo o local irrigado com soro fisiológico por meio de seringa descartável. Após abertura coronária, o canal radicular foi preenchido com soro fisiológico e realizou-se a

agitação com uma lima endodôntica tipo Kerr número 20, no comprimento de trabalho provisório (comprimento radiográfico de dente menos 2 mm), confirmado pela odontometria, com o objetivo de dessorção do material necrótico das paredes do canal radicular.

A amostra microbiológica para a técnica de cultura e para a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi obtida com a própria lima tipo K n° 20, utilizada na agitação e posterior movimento de limagem, e de três pontas de papel absorvente esterilizadas (Tanari Industrial Ltda – Manaus – AM), introduzidas até o comprimento real do dente e mantidas no local por um minuto. As pontas de papel absorventes com as amostras do canal radicular, bem como a lima tipo K seccionada próxima ao cabo, foram transferidas imediatamente após a colheita para um tubo de ensaio contendo 4,0 ml de fluido de transporte reduzido (RTF) (Figura 1).



FIGURA 1 – Seqüência da colheita microbiológica das amostras

Os tubos foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP para o processamento das amostras.

Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Cultura

Aos tubos de ensaio contendo as amostras de material (cones de papel e lima), tubo-mãe, foram adicionadas 4 a 6 pérolas de vidro de 1,0mm de diâmetro e uma aleta metálica, sendo os tubos submetidos à agitação por 2 minutos em mixer (Mixtron - Toptronix - São Paulo - SP - Brasil), em velocidade máxima, com a finalidade de dessorção dos microrganismos. A seguir, uma alíquota de 1,0ml da suspensão foi transferida para tubos Eppendorf (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany) para o teste de Biologia Molecular. O restante da suspensão foi submetido a diluições decimais seriadas, até 10^{-4} , em solução salina em fluxo laminar. Volumes de 50,0 μ l da amostra pura e de cada diluição foram depositados em placas com o auxílio de pipeta automática, contendo os meios As (para aeróbios), AsK (para desenvolvimento de anaeróbios) e em Mitis salivaris (Ms) para o isolamento do grupo estreptococos (facultativos).

Aos tubos-mãe foram adicionados cerca de 5,0ml de meio Tio's, com a finalidade de detectar os microrganismos presentes em níveis inferiores a 20ufc/ml. Para o preparo deste meio foram pesados 24,0g de *Thioglycollate medium without Dextrose or Indicator* (Difco), colocados em balão de Erlenmeyer com um litro de água destilada. Após homogeneização e fusão do ágar, foram distribuídos em tubos de 15x125mm, em volumes de cerca de 10,0ml, esterilizados a 120°C por 20 minutos.

Para o preparo do meio ágar sangue (As), foram adicionados 500,0ml de água destilada a 40,0g de *Tryptic Soy Agar* (Difco), em balão de 1000,0ml, autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C, foram adicionados, assepticamente, 5,0% de sangue desfibrinado de coelho, 5,0µg/ml de hemina (Sigma) e 1,0µg/ml de menadiona (Sigma). A seguir, o meio foi distribuído assepticamente em placas de Petri de 10x60mm esterilizadas, em volumes de 5,0ml por placa (Anexo A1 – Composição dos Meios de Cultura).

Este meio de cultura foi empregado para o isolamento de microrganismos aeróbios nutricionalmente exigentes, de difícil desenvolvimento.

Com a mesma base do As foi feito o preparo do meio ágar sangue enriquecido com hemina e menadiona (Ask). Para o preparo deste meio, foram adicionados 500,0ml de água destilada a 40,0g de *Tryptic Soy Agar* (Difco), em balão de 1000,0ml, autoclavada a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C, foram adicionados, assepticamente, 5,0% de sangue desfibrinado de coelho, 5,0µg/ml de hemina (Sigma) e 1,0µg/ml de menadiona (Sigma). A seguir, o meio foi distribuído assepticamente em placas de Petri de 10x60mm esterilizadas, em volumes de 5,0ml por placa.

Este meio de cultura foi empregado para a contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de microrganismos anaeróbios, nutricionalmente exigentes.

As condições de anaerobiose foram obtidas por meio do sistema Anaerobac (Probac-Brasil), em jarras seladas contendo as placas e incubadas a 37° C por 10 dias.

As placas incubadas em aerobiose foram colocadas diretamente em estufa a 37° C.

As colônias foram contadas após o período de incubação, com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Nikon) e os valores foram anotados para posterior cálculo do número de ufc por canal radicular.

Metodologia Estatística

As contagens de microrganismos, relativas aos grupos de necropulpectomia e espécies de microrganismos, foram transformadas para logaritmo e avaliadas pela análise de variância de dois fatores. Para a tomada de decisão adotou-se o nível de significância usual de 5%. A análise de variância depende da homogeneidade de variâncias (provada pelo teste de Levene) e da normalidade dos erros experimentais (provada pelo teste de Shapiro-Wilk). Essas condições devem ser válidas pelo menos aproximadamente.

Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Preparo das Amostras

Os *eppendorf* contendo as amostras foram centrifugados a 4.000rpm durante 15 minutos a 8°C (Rotina 35R - Hettich - Zentrifugen). Após a centrifugação, o sobrenadante foi vertido em tubo de ensaio e descartado. A seguir, foram adicionados com pipetador automático 150µl de tampão Tris e submetidos à agitação manual vigorosa, a fim de suspender o sedimento. Com o auxílio de uma pipeta automática foram adicionados 150µl de NaOH a 0,5M, seguido também por agitação manual vigorosa.

Os *eppendorfs* contendo as amostras foram armazenados em geladeira a 4°C.

Extração do DNA

Como anteriormente descrito por Socransky et al.⁹⁰ (1994) e modificado por Haffajee et al.³⁶ (1997), as suspensões dos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos. Após a fervura, as suspensões foram neutralizadas com a adição de 0,8ml de 5M de acetato de amônia (77g em 200ml de água destilada esterilizada). Desta forma, as células bacterianas foram lisadas e o DNA suspenso na solução. Na primeira fase de montagem do “checkerboard”, a placa metálica contendo 30 canaletas, denominada “Minislot 30” (Immunitics, Cambridge, MA, USA), foi colocada sobre uma membrana de nylon (15x15cm) com carga positiva (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) e o conjunto aparafusado sobre uma base de acrílico. Cada suspensão contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot 30” e o DNA foi concentrado na membrana de nylon. A seguir, a membrana foi removida do aparato e exposta ao calor (120°C), durante

20 minutos para a fixação do DNA. Na membrana foram depositadas 20 amostras, sendo as duas últimas canaletas reservadas para a colocação dos controles, representados por uma suspensão contendo todas as espécies microbianas avaliadas em duas concentrações (10^5 e 10^6 células bacterianas) (Figura 2).

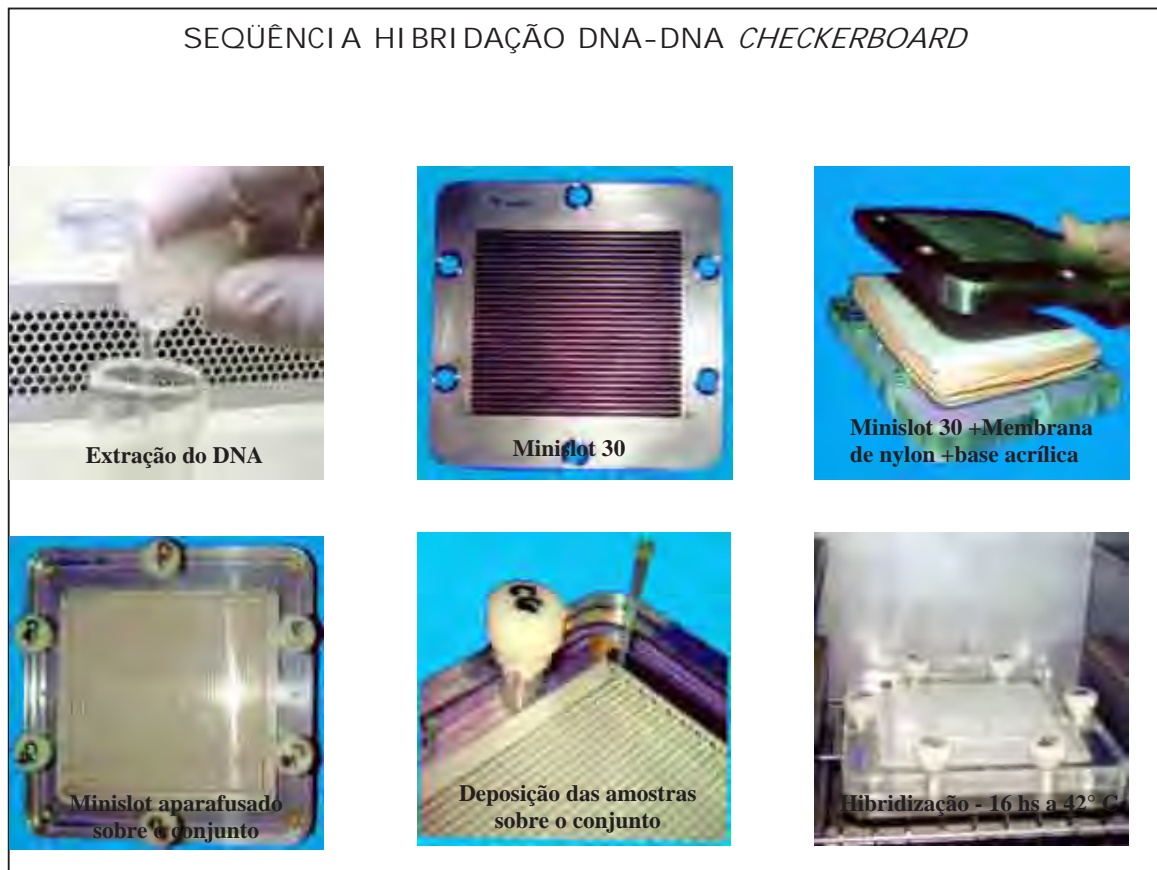


FIGURA 2 – Seqüência da técnica de Hibridação DNA-DNA *Checkerboard*

Preparo das Sondas de DNA

As sondas de DNA foram confeccionadas usando o kit “random primer digoxigenin labelling” (Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA). A tabela 1 apresenta as 33 sondas de DNA empregadas, específicas para as espécies avaliadas neste estudo,

selecionadas de acordo com a sua associação com diferentes tipos de infecções endodônticas (HAFFAJEE E SOCRANSKY,³⁶ 1994; MOORE E MOORE,⁵⁵ 1994).

Tabela 1 - Espécies bacterianas utilizadas na confecção das sondas genômicas de DNA

Espécies bacterianas	Procedência da cepa	Morfotipo	Fisiologia
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo b	ATCC 29523	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo a	ATCC 43718	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 1	ATCC 12104	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces viscosus</i>	ATCC 43146	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces israelii</i>	ATCC 12102	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	ATCC 23860	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces odontolyticus</i> I	ATCC 17929	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Tannerella forsythensis</i> (<i>Bacteroides forsythus</i>)	ATCC 43037	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238	Bastonete Gram-negativo	Aeróbio
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	ATCC 33485	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ATCC 358	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Eubacterium nodatum</i>	ATCC 33099	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Eikenella corrodens</i>	ATCC 23834	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Eubacterium sabbureum</i>	ATCC 33271	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>polymorphum</i>	ATCC 10953	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>nucleatum</i>	ATCC 25586	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC 33270	Coco Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Propionibacterium acnes</i> I	ATCC 11827	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 25845	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 33397	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 27335	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus gordonii</i>	ATCC 10558	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 35037	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Selenomonas noxia</i>	ATCC 43541	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Treponema denticola</i>	†B1	Espiroqueta Gram-negativo	Anaeróbio

†Cepa B1, Forsyth Institute, Boston, MA.

ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

Destas 33 sondas, 19 espécies foram de microrganismos anaeróbios (7 Gram-negativo e 12 Gram-positivo), outras 13 sondas de facultativos (4 Gram-negativo e 8 Gram-positivo) e 1 sonda de aeróbio (1 Gram-negativo).

As cepas foram cedidas pelo Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ e pelo Instituto Nacional de Controle

de Qualidade em Saúde (INCQS), estando disponíveis no Laboratório de Microbiologia Oral da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Hibridação das Membranas com as Sondas de DNA

Após a fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridadas a 42°C, durante 1 hora, em uma solução de 50% de formamida, 5 x SSC (1 SSC = 150mM NaCl, 15mM citrato de sódio, pH 7.0), 1% de caseína, 25mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0,5mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, a membrana foi colocada sob a placa acrílica do aparelho “Miniblotter 45” (Immunetics), de maneira que as linhas contendo o DNA fixado ficaram em uma posição perpendicular às canaletas do “Miniblotter 45”.

O “Miniblotter 45” contém 45 canaletas onde, em cada uma delas, foi colocada uma sonda de DNA. Cada canaleta foi preenchida com 130µl de uma determinada sonda, contida em uma solução de hibridação (45% formamida, 5xSSC, 20mM de fosfato de sódio - pH 6.5, 0,2mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20ng/mg de sonda de DNA). As sondas hibridaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano, propiciando um formato xadrez, com as amostras de DNA horizontais e as sondas verticais. O aparato contendo as membranas foi colocado em um saco de plástico, para evitar a desidratação das mesmas. A hibridação das amostras nas membranas com as sondas foi realizada a 42°C, durante um período mínimo de 16 horas.

Deteção das Espécies Bacterianas

Após a hibridação com as sondas, a membrana foi removida do “Miniblotter 45” e lavada durante 5 minutos em temperatura ambiente, seguida de duas lavagens de 20 minutos cada a 68°C, em uma solução contendo 20mM fosfato, 1mM EDTA e 1% SDS,

com o objetivo de remover as sondas que não hibridaram completamente. Após este procedimento, a membrana foi imersa durante 1 hora em uma solução de bloqueio contendo 0,1M de ácido maléico, 3M de cloreto de sódio, 0,2M de hidróxido de sódio, 0,3% de Tween 20 e 0,5% de caseína em pH 8.0. A seguir, foi imersa durante 30 minutos na mesma solução, agora contendo também o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA), em uma diluição de 1/25.000.

Posteriormente, a membrana foi lavada com uma solução de 0,1M de ácido maléico, 3M de cloreto de sódio, 0,2M de hidróxido de sódio e 0,3% de Tween 20, em pH 8.0, 2 vezes durante 15 minutos e uma vez durante 5 minutos em 50mM Tris HCl e 50mM de cloreto de sódio em pH 9.5. A membrana foi então incubada em uma solução contendo o substrato para a enzima CDP-Star[®] (Amersham Pharmacia Biotech), durante 45 minutos.

Finalmente, a membrana foi colocada em um cassete de autoradiografia, sob um filme radiográfico (Kodak X-OMAT, Rochester-NY - USA) durante aproximadamente 40 minutos e, a seguir, revelado para a detecção dos sinais de quimioluminescência. Ao final, foi obtido um filme radiográfico com os sinais detectados pelas sondas de DNA, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de “tabuleiro de xadrez” (Figura 3).

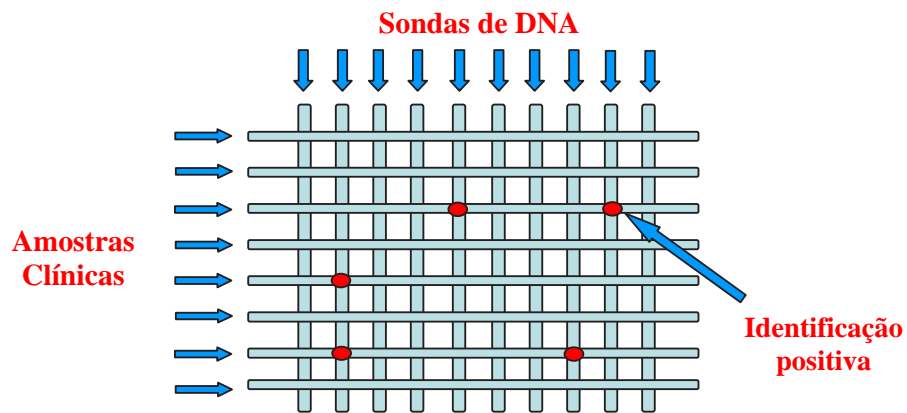


FIGURA 3 – Hibridação do *checkerboard*

A leitura dos resultados foi realizada por meio da ausência (score 0) ou presença (score1) dos sinais das amostras dos canais radiculares. Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador calibrado. Os resultados obtidos foram anotados em fichas específicas.

5 Resultados

5.1 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio da Técnica de Cultura Microbiológica

As amostras colhidas dos canais radiculares dos casos classificados como necropulpectomia I e II foram quantificadas nos três meios utilizados para crescimento de microrganismos: AsK para anaeróbios estritos, Ms para o grupo Estreptococos (anaeróbios facultativos) e As para aeróbios, como, pode ser observado no Quadro 1.

Em todas as amostras havia microrganismos mesmo que em quantidade inferior a 20ufc/ml, como pode ser observado através do cultivo em meio Tio's.

Quadro 1 – Número de UFC de anaeróbios obrigatórios, aeróbios e estreptococos nos grupos relacionados aos casos de necropulpectomia I e II

Grupo I – Necropulpectomia I					Grupo II – Necropulpectomia II			
Amostras	Anaeróbios estritos	Aeróbios	Estreptococos	Tio's	Anaeróbios estritos	Aeróbios	Estreptococos	Tio's
1	0	1560	770	+	13500	460	5300	+
2	0	0	2510	+	36000	550	5900	+
3	14700	13100	990	+	5600	150	120	+
4	8300	11200	890	+	206000	1490	7900	+
5	40333	1640	910	+	2120	1410	1070	+
6	240	80	60	+	102000	120	3100	+
7	22200	60	60	+	0	0	1910	+
8	720	200000	27000	+	480000	49866	50000	+
9	80	40	100	+	35000	250	720	+
10	21300	60	100	+	72666	70000	1050	+

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as contagens de microrganismos, em ufc, de acordo com o tipo de microrganismo: anaeróbio estrito, aeróbio ou estreptococos, respectivamente para os grupos I e II (casos classificados como necropulpectomia I e II).

Considerando que as medidas não variam simetricamente em torno da média, são apresentadas nas Tabelas 2 e 3 alguns dados estatísticos: mínimo, máximo e mediana, que permitem descrever melhor os dados experimentais.

Tabela 2 - Contagem de ufc de microrganismos no grupo I

Amostra	Microrganismo		
	Anaeróbio estrito	Aeróbio	Estreptococo
1	0	1560	770
2	0	0	2510
3	14700	13100	990
4	8300	11200	890
5	40333	1640	910
6	240	80	60
7	22200	60	60
8	720	200000	27000
9	80	40	100
10	21300	60	100
Mínimo	0	0	60
Máximo	40333	200000	27000
Mediana	4510	820	830
Média	10787,3	22774	3339

Tabela 3 - Contagem de ufc de microrganismos no grupo II

Amostra	Microrganismo		
	Anaeróbio estrito	Aeróbio	Estreptococo
1	13500	460	5300
2	36000	550	5900
3	5600	150	120
4	206000	1490	7900
5	2120	1410	1070
6	102000	120	3100
7	0	0	1910
8	480000	49866	50000
9	35000	250	720
10	72666	70000	1050
Mínimo	0	0	120
Máximo	480000	70000	50000
Mediana	35500	505	2505
Média	95288,6	12429,6	7707

Os dados obtidos possibilitaram a realização de análise de variância com as contagens de microrganismos transformadas para logaritmo. O resultado desta análise é apresentado na Tabela 4. A homogeneidade de variância, exigida pela análise estatística, foi comprovada pelo teste de Levene ($p > 0,05$) e a normalidade dos erros experimentais foi considerada aproximada, já que o valor-p correspondente ao teste de Shapiro-Wilk, apesar de significativo ao nível de 5%, não é significativo ao nível um pouco menor de 1%.

Pelo sumário da análise de variância nota-se que nenhum efeito estudado é significativo ($p > 0,05$), ainda que o resultado referente ao efeito de grupos seja marginal (p somente um pouco maior do que 0,05). Isso se deve à tendência da média de logaritmo de contagem para o microrganismo anaeróbio estrito no grupo II tender a ser maior que as outras.

Ainda na Figura 4, é dado o gráfico das médias de logaritmos de ufc, juntamente com intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais. Quanto maior a sobreposição desses intervalos, menor é a evidência de diferença entre médias.

Tabela 4 - Sumário da análise de variância para a comparação de médias de logaritmos de ufc

Efeito	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Grupo	1	6,850	3,670	0,061
Microrganismo	2	2,758	1,478	0,237
Interação	2	1,709	0,916	0,406
Resíduo	54	1,866		

Homogeneidade de variâncias: $p=0,141$ (Levene)
Normalidade dos resíduos: $p=0,014$ (Shapiro-Wilk)

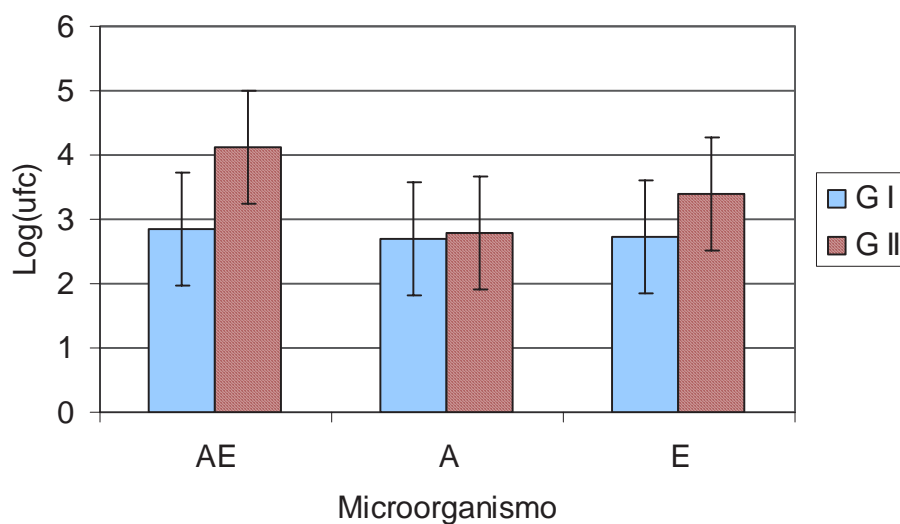


FIGURA 4 - Representação gráfica de médias de logaritmo de ufc - a barra vertical representa um intervalo de confiança de 95% para a média populacional AE – aneróbio, A – aeróbio e E – Estreptococos

5.2 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Hibridação DNA-DNA *Checkerboard*

A técnica de hibridação DNA – DNA *checkerboard* permitiu a identificação de 32 espécies diferentes nos casos de necropulpectomia II e de 31 espécies diferentes nos casos de necropulpectomia I, tendo sido utilizadas sondas relativas a 33 microrganismos diferentes. Das 32 espécies detectadas, 26 estiveram presentes com maior frequência nos canais radiculares de casos de necropulpectomia II (Grupo II); 4 espécies diferentes mantiveram-se iguais quanto a presença nos casos de necropulpectomia I e II; 2 espécies diferentes foram mais frequentes nos casos de necropulpectomia I (Grupo I); e uma espécie, *Selenomonas noxia* (ATCC 43541) não foi detectada em nenhum canal radicular.

Para a técnica de hibridação DNA – DNA *checkerboard* foram avaliadas 33 espécies de microrganismos, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 – Classificação dos microrganismos estudados

Espécies bacterianas	Morfotipo	Fisiologia
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo b	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo a	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 1	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces viscosus</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces israelii</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Actinomyces odontolyticus</i> I	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Tannerella forsythensis</i> (<i>Bacteroides forsythus</i>)	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Campylobacter rectus</i>	Bastonete Gram-negativo	Aeróbio
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Eubacterium nodatum</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Eikenella corrodens</i>	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Eubacterium sabbureum</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>polymorphum</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>nucleatum</i>	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Neisseria mucosa</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Prevotella intermedia</i>	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Propionibacterium acnes</i> I	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Streptococcus constellatus</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus anginosus</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus gordonii</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus oralis</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus sanguis</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus mitis</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Selenomonas noxia</i>	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Treponema denticola</i>	Espiroqueta Gram-negativo	Anaeróbio

Das 33 sondas utilizadas, 31 foram positivas nos canais radiculares dos casos de necropulpectomia I (Grupo I), sendo identificadas de 1 a 19 espécies bacterianas anaeróbias por amostra (média de 9,5), e de 0 a 11 espécies bacterianas aeróbias/facultativas por amostra (média de 5,8). No total a média de microrganismos identificados para os casos de necropulpectomia I foi de 15,4 por canal variando de 3 a 30 microrganismos por casos avaliado.

Das 33 sondas utilizadas, 32 foram positivas nos canais radiculares dos casos de necropulpectomia II (Grupo II), sendo identificadas de 3 a 19

espécies bacterianas anaeróbias por amostra (média de 12,5), e de 2 a 12 espécies bacterianas aeróbias/facultativas por amostra (média de 8,5).

Dos 20 canais radiculares avaliados, todos apresentaram evidência de sinal positivo (100%) para pelo menos uma sonda.

Do total de amostras, 11 canais radiculares apresentaram 21 ou mais espécies bacterianas diferentes (55%) e 9 (45%), apresentaram menos que 20 espécies por canal radicular.

Nos casos de necropulpectomia I (Grupo I), seis sondas investigadas estavam presentes em mais de 50% dos canais radiculares, ou seja, *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum* (80%), *Propionibacterium acnes* I (60%), *Porphyromonas gingivalis* (80%), *Prevotella melaninogenica* (90%), *Streptococcus gordonii* (70%), *Treponema denticola* (70%). Por outro lado, duas sondas não foram detectadas em nenhuma das amostras deste grupo (*Streptococcus mitis* e *Selenomonas noxia*).

Já nos casos de necropulpectomia II (Grupo II), três sondas analisadas estiveram presentes em 100% dos canais radiculares, sendo elas *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum*, *Neisseria mucosa* e *Porphyromonas gingivalis*; e uma sonda não foi detectada em nenhuma das amostras deste grupo (*Selenomonas noxia*).

Um canal radicular pertencente ao Grupo II (Necropulpectomia II) apresentou o menor número de espécies investigadas neste grupo, três microrganismos anaeróbios e dois microrganismos aeróbios/facultativos. No Grupo I (Necropulpectomia I), duas amostras não apresentaram microrganismos aeróbios/facultativos.

Os microrganismos predominantes nos casos de Necropulpectomia II foram *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum*, *Neisseria mucosa* e *Porphyromonas gingivalis* (100%). Na Necropulpectomia I, a *Prevotella melaninogenica* foi o

microrganismo predominante, estando presente em 90% dos canais radiculares deste grupo. O *Streptococcus mitis* esteve presente em um único canal radicular dos casos de Necropulpectomia II e em nenhum canal radicular de Necropulpectomia I.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os resultados da prevalência das espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares dos Grupos I e II. A Tabela 8 mostra a presença de microrganismos anaeróbios e aeróbios/facultativos detectados pelo método de Hibridação DNA-DNA *Checkerboard*, nos Grupos I e II.

Tabela 6 – Prevalência de espécies bacterianas em 10 amostras de canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar sem lesão periapical (Grupo I)

Espécies	Número de amostras positivas	Prevalência (%)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo b	5	50
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo a	5	50
<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 1	4	40
<i>Actinomyces viscosus</i>	4	40
<i>Actinomyces israelii</i>	4	40
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	4	40
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	4	40
<i>Tannerella forsythensis</i> (<i>Bacteroides forsythus</i>)	3	30
<i>Campylobacter rectus</i>	5	50
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	5	50
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	4	40
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	5	50
<i>Eubacterium nodatum</i>	4	40
<i>Eikenella corrodens</i>	4	40
<i>Eubacterium sabbureum</i>	4	40
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	4	40
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>polymorphum</i>	8	80
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>nucleatum</i>	4	40
<i>Neisseria mucosa</i>	2	20
<i>Prevotella intermedia</i>	4	40
<i>Peptostreptococcus micros</i>	4	40
<i>Propionibacterium acnes I</i>	6	60
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8	80
<i>Prevotella melaninogenica</i>	9	90
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	10
<i>Streptococcus anginosus</i>	5	50
<i>Streptococcus intermedius</i>	5	50
<i>Streptococcus gordonii</i>	7	70
<i>Streptococcus oralis</i>	4	40
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3	30
<i>Streptococcus mitis</i>	0	0,0
<i>Selenomonas noxia</i>	0	0,0
<i>Treponema denticola</i>	7	70

Tabela 7 - Prevalência de espécies bacterianas em 10 amostras de canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar com lesão periapical (Grupo II)

Espécies	Número de amostras positivas	Prevalência (%)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo b	9	90
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo a	8	80
<i>Actinomyces naeslundii</i> genospecies 1	6	60
<i>Actinomyces viscosus</i>	4	40
<i>Actinomyces israelii</i>	6	60
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	6	60
<i>Actinomyces odontolyticus I</i>	6	60
<i>Tannerella forsythensis</i> (<i>Bacteroides forsythus</i>)	7	70
<i>Campylobacter rectus</i>	9	90
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	8	80
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	8	80
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	7	70
<i>Eubacterium nodatum</i>	4	40
<i>Eikenella corrodens</i>	8	80
<i>Eubacterium sabbureum</i>	6	60
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	7	70
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>polymorphum</i>	10	100
<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp <i>nucleatum</i>	5	50
<i>Neisseria mucosa</i>	10	100
<i>Prevotella intermedia</i>	7	70
<i>Peptostreptococcus micros</i>	3	30
<i>Propionibacterium acnes I</i>	7	70
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	7	70
<i>Streptococcus constellatus</i>	3	30
<i>Streptococcus anginosus</i>	5	50
<i>Streptococcus intermedius</i>	6	60
<i>Streptococcus gordonii</i>	7	70
<i>Streptococcus oralis</i>	6	60
<i>Streptococcus sanguinis</i>	7	70
<i>Streptococcus mitis</i>	1	10
<i>Selenomonas noxia</i>	0	0,0
<i>Treponema denticola</i>	8	80

Tabela 8 – Presença de microrganismos anaeróbios e aeróbios/facultativos detectados pelo método de Hibridação DNA-DNA *Checkerboard*, nos Grupos I e II

NECROPULPECTOMIA I

AMOSTRAS / CLASSIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	TOTAL DE ESPÉCIES DE MICRORGANISMOS	ANAERÓBIOS	AERÓBIOS / FACULTATIVOS
1	9	4 (44,4%)	5 (55,6%)
2	30	19 (63,3%)	11 (36,7%)
3	26	16 (61,5%)	10 (38,5%)
4	29	18 (62%)	11 (38%)
5	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)
6	13	6 (46,1%)	7 (53,9%)
7	28	18 (64,3%)	10 (35,7%)
8	6	4 (66,6%)	2 (33,4%)
9	5	5 (100%)	0 (0,0%)
10	4	4 (100%)	0 (0,0%)
Média	15,40	61,70%	38,30%

NECROPULPECTOMIA II

AMOSTRAS / CLASSIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO	TOTAL DE ESPÉCIES DE MICRORGANISMOS	ANAERÓBIOS	AERÓBIOS / FACULTATIVOS
1	28	16 (57,1%)	12 (42,9%)
2	27	19 (70,4%)	8 (29,6%)
3	22	15 (68,2%)	7 (31,8%)
4	21	15 (71,4%)	6 (28,6%)
5	28	18 (64,3%)	10 (35,7%)
6	23	13 (56,5%)	10 (43,5%)
7	19	8 (42,1%)	11 (57,9%)
8	25	13 (52%)	12 (48%)
9	12	5 (41,6%)	7 (58,4%)
10	5	3 (60%)	2 (40%)
Média	21,00	59,52%	40,48%

As Figuras 5 e 6 apresentam a frequência das espécies estudadas nos casos de Necropulpectomia I e II.

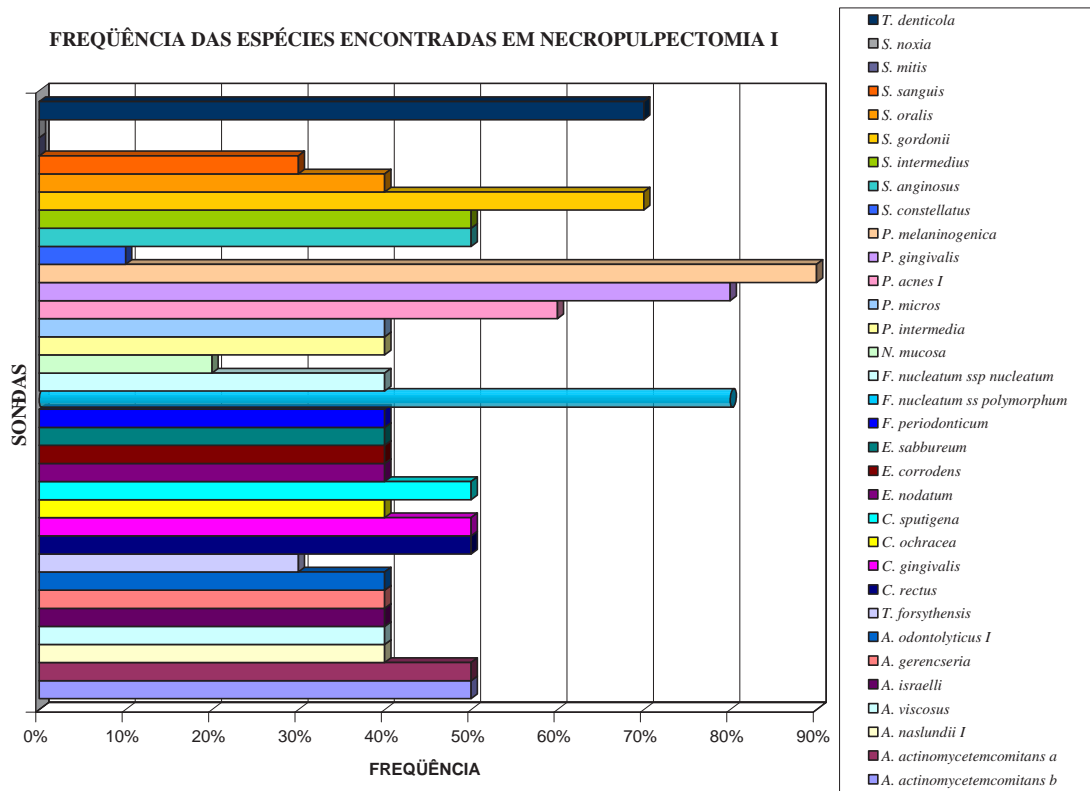


FIGURA 5- Prevalência das diferentes espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares de dentes permanentes portadores de necrose pulpar sem lesão periapical crônica (Necropulpectomia I)

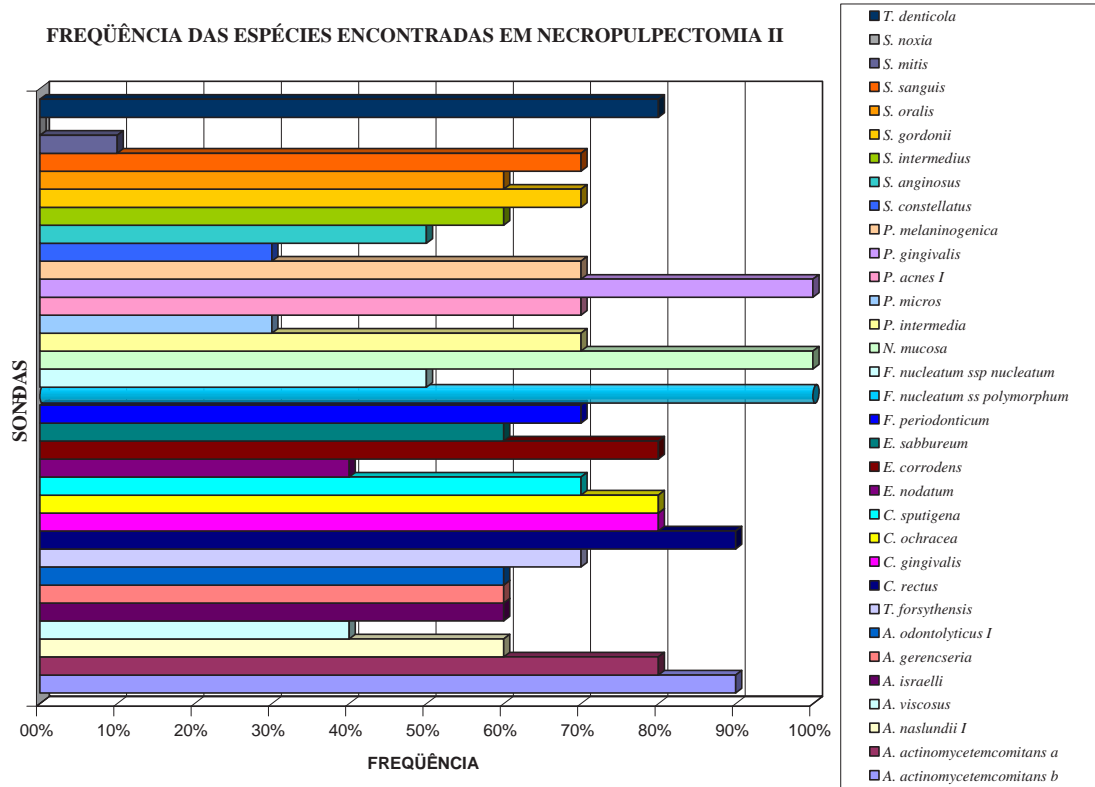


FIGURA 6 - Prevalência das diferentes espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares de dentes permanentes portadores de necrose pulpar com lesão periapical crônica (Necropulpectomia II)

6 Discussão

6.1 Da Proposição e Metodologia

O tratamento endodôntico tem como objetivos a limpeza, modelagem e obturação mais hermética possível do sistema de canais radiculares após preparo biomecânico e desinfecção do sistema de canais radiculares, criando condições para o processo de reparo dos tecidos apicais e periapicais. Nos casos de dentes com vitalidade pulpar a manutenção da cadeia asséptica e respeito à vitalidade dos tecidos apicais e periapicais constituem os principais objetivos da terapia endodôntica. A ausência de infecção do sistema de canais radiculares proporciona maior índice de sucesso nestas situações.

Nos casos de dentes com necrose pulpar, o controle da infecção endodôntica passa a constituir objetivo essencial para o êxito do tratamento endodôntico. No início da instalação do processo infeccioso no tecido pulpar, observa-se a prevalência de uma microbiota Gram-positiva, composta principalmente por microrganismos aeróbios e facultativos, com predomínio de cocos sobre os bacilos e filamentosos (FABRICIUS et al.²², 1982). No entanto, a partir da década de 80, com os avanços nas técnicas de cultura e identificação microbiológica têm-se evidenciado que, em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica visível radiograficamente, predominam os microrganismos anaeróbios estritos (SUNDQVIST ⁹⁷, 1976; FABRICIUS et al ²²., 1982; GOMES et al ³¹., 1996), particularmente Gram-negativos (ASSED et al ³., 1996).

A presença de lesão periapical visível radiograficamente é correlacionada ao desenvolvimento de um processo infeccioso de longa duração, com predomínio de

microrganismos anaeróbios estritos, propagação microbiana para o sistema de canais radiculares e presença de LPS bacteriano (JUNG et al.⁴², 2000; LEONARDO et al.⁴⁹, 2002).

A presença de necrose pulpar sem lesão periapical está relacionada a um processo infeccioso recente do canal radicular, sendo difícil estabelecer, clínica e radiograficamente, quando ocorre a propagação dos microrganismos para o sistema de canais radiculares e o momento em que ocorre o *shift* bacteriano, estabelecendo condição de predomínio de microrganismos anaeróbios estritos (LEONARDO⁴⁸, 2005).

Diversos estudos têm sido realizados para avaliação da microbiota endodôntica (SHOVELTON⁷², 1964; GOMES et al.²⁹, 1996; EGAN et al.²¹, 2002) nas diferentes condições clínicas (casos de necrose pulpar, abscessos dento-alveolares agudos e crônicos, granulomas e cistos periapicais, retratamentos, cirurgias parendodônticas), estabelecendo correlações entre sinais e sintomas presentes e microrganismos detectados (GOMES et al.²⁷, 1994; GATTI et al.²⁶, 2000; SIQUEIRA JR. et al.⁸², 2005; MUNSON et al.⁵⁸, 2002).

O presente estudo visou à detecção dos microrganismos que compõem a microbiota do canal radicular em casos de dentes sem vitalidade pulpar com e sem lesão periapical visível radiograficamente. Para tanto, duas técnicas de identificação de microrganismos do canal radicular foram utilizadas: a convencional cultura microbiológica e a técnica de biologia molecular denominada *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

A técnica de cultura apresenta dificuldade na detecção de microrganismos de difícil crescimento, mas é o único método capaz de identificar apenas microrganismos viáveis. Diversos autores têm utilizado esta técnica para identificação dos microrganismos presentes nas infecções endodônticas (SOCRANSKY et al.⁸⁹, 1959; WINKLER e VAN AMERONGEN¹⁰⁷, 1959; KEUDELL et al.⁴⁵, 1976; GOMES et al.³⁰, 1996; DRUCKER et

al.²⁰, 1997; DOUGHERTY et al.¹⁹, 1998, SUNDQVIST et al.⁹⁹, 1989; FERRARI et al.²³, 2005). A cultura microbiológica é uma técnica tida como padrão de referência na identificação da microbiota associada com várias doenças infecciosas, incluindo as infecções endodônticas.

O advento da biologia molecular utilizada no diagnóstico microbiológico tem possibilitado a detecção de microrganismos pouco encontrados na microbiota endodôntica, colaborando para a melhor compreensão da microbiota envolvida nas infecções endodônticas. O método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi desenvolvido por Socransky et al.⁹⁰ (1994) e possibilita análise de uma ou mais amostras clínicas, detectando até 40 espécies bacterianas diferentes em uma mesma membrana. Além disto, é possível identificar espécies microbianas que apresentam dificuldade de crescimento nos métodos convencionais de cultura.

O método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* não é influenciado pela perda de viabilidade dos microrganismos durante o transporte e nem pela dificuldade de crescimento de espécies de difícil cultivo. Porém, a detecção dos microrganismos é limitada a espécies cujas amostras estão disponíveis, sendo necessário controle de qualidade para evitar a ocorrência de reações cruzadas entre as espécies (SOCRANSKY et al.⁹¹, 2004).

Os casos incluídos no estudo foram cuidadosamente selecionados observando-se alguns critérios clínicos tais como: ausência de vitalidade pulpar, mobilidade dental, doença periodontal e fístula. Ainda, alguns outros fatores de exclusão foram listados como: antibioticoterapia recente, impossibilidade de isolamento absoluto do dente envolvido, presença de sintomatologia, comunicação direta da câmara pulpar com o meio bucal e histórico de traumatismo.

Para possibilitar a divisão dos casos selecionados em grupos (Grupo 1 – dentes sem vitalidade pulpar com ausência de lesão periapical radiográfica e Grupo 2 - dentes sem vitalidade pulpar com presença de lesão periapical radiográfica), a técnica radiográfica, o filme, o aparelho de raios X e o tempo de exposição bem como o processamento de radiográfico foram padronizados. Da mesma forma, examinadores experientes realizaram a avaliação das radiografias e a divisão dos grupos.

A colheita do conteúdo dos canais radiculares foi realizada sob isolamento absoluto e após a anti-sepsia do campo operatório, para minimizar o risco de contaminação dos canais com microrganismos da microbiota bucal. A desinfecção do campo operatório foi realizada com digluconato de clorexidina a 2% para impedir contaminação do canal radicular por bactérias de áreas subjacentes ao dente (NG et al.⁶¹, 2003).

As amostras microbiológicas foram obtidas introduzindo-se seqüencialmente cones de papel absorvente esterilizados no canal radicular. Antes da introdução dos cones de papel no canal radicular, o mesmo foi inundado com soro fisiológico, agitando-se o seu conteúdo com uma lima Kerr n° 20, para suspensão o material presente no canal radicular (BYSTROM e SUNDQVIST^{10,11,12}, 1985, 1983, 1981; BYSTROM et al.^{13,14}, 1985, 1987).

As amostras colhidas para análise microbiológica foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2,5 ml de fluido de transporte reduzido (RTF), sendo colocadas em um recipiente térmico, contendo gelo e levadas para o processamento microbiológico aproximadamente 2 horas após a colheita. O meio RTF mantém a viabilidade das bactérias entre o período de colheita e o início do processamento da cultura, sendo a possibilidade de reprodução microbiana bastante reduzida, o que atenua as variações quantitativas ou qualitativas em relação ao sítio de origem da amostra (BYSTROM e SUNDQVIST^{10,11,12}, 1985, 1983, 1981; BYSTROM et al.^{13,14}, 1985, 1987; FABRICIUS et al.²², 1982).

O material colhido para a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* após ser transferido para tubos *Eppendorf*, foi estocado em geladeira para posterior processamento das amostras, todas em um mesmo momento (COLOMBO et al.¹⁶, 2002; SIQUEIRA JR.⁷³, 2003).

As amostras microbiológicas foram semeadas nos meios ágar sangue (As), incubadas em aerobiose para detecção de microrganismos aeróbios, ágar sangue enriquecido com hemina e menadiona (Ask), incubadas em anaerobiose para o crescimento de microrganismos anaeróbios e em *Mitis salivaris* (Ms) para o isolamento do grupo estreptococos (facultativos), permitindo condições adequadas de crescimento para a variada microbiota dos canais radiculares.

Desta foram, a avaliação pelo método de cultura microbiológica possibilitou a avaliação quantitativa geral e proporcional dos diferentes tipos de microrganismos de acordo com a suas propriedades metabólicas.

Para Loesche et al.⁵⁰, 1992, a metodologia de cultura não é indicada, isoladamente, em estudos de prevalência. De acordo com o autor, métodos que utilizam reagentes imunológicos ou hibridação DNA-DNA *checkerboard*, são significativamente superiores ao método convencional de cultura microbiológica na detecção de espécies bacterianas.

Neste estudo foi utilizada a técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard* para avaliação específica de uma série de espécies bacterianas da microbiota endodôntica, já que diversos estudos têm demonstrado a presença de espécies de difícil crescimento, detectadas somente quando utilizados métodos de biologia molecular (CONRADS et al.¹⁷, 1997; MUNSON et al.⁵⁸, 2002; SIQUEIRA JR. et al.⁸⁶, 2001; XIA e BAUGARTNER¹⁰⁹, 2003; XIA et al.¹¹⁰, 2000).

A determinação da microbiota endodôntica utilizando a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi realizada de acordo com a técnica já descrita por Socransky et al.⁹⁰ (1994) e utilizada por Colombo et al.¹⁶ (2002) e Souza⁹⁴ (2003).

6.2 Dos Resultados

Em todas as amostras dos canais radiculares dos casos de necropulpectomia I e II (Grupos I e II) analisadas por meio da técnica de cultura microbiológica, foram detectados microrganismos, mesmo que em quantidade inferior a 20 ufc/ml, como pôde ser observado pelo cultivo em meio Tio's. Em 80% dos casos de necropulpectomia I (8 amostras) foram detectados anaeróbios estritos, aeróbios e facultativos, enquanto que em uma amostra foram detectados aeróbios e facultativos e em outra única amostra apenas facultativos. Em duas amostras do Grupo I (20%) não foram observados anaeróbios estritos, podendo estar relacionado ao fato de que os anaeróbios estritos iniciam o seu desenvolvimento a partir das mudanças do ambiente do canal radicular e das condições de desenvolvimento de ambiente anaeróbio. Ainda, o método de colheita pode dificultar a viabilização do crescimento de microrganismos anaeróbios.

Já nas amostras do Grupo II (necropulpectomia II), houve um predomínio de microrganismos anaeróbios estritos sobre os aeróbios e facultativos. Estes achados concordam com outros estudos que demonstraram que as infecções endodônticas são, em geral, polimicrobianas, com predomínio de bactérias anaeróbias estritas (FUKUSHIMA et al.²⁵, 1990; GOMES^{27,28,29}, 1994, 1996; SUNDQVIST⁹⁶, 1992).

Embora tenha sido observado maior número de microrganismos anaeróbios para os casos de necropulpectomia II, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Esta situação pode estar relacionada ao fato de que os casos selecionados para os dois grupos apresentavam câmara pulpar fechada, sem comunicação direta com o meio bucal, o que pode viabilizar maior crescimento de microrganismos anaeróbios também detectado nos casos de necropulpectomia I. Fabricius et al.²², observaram que após o selamento da câmara pulpar de dentes de macacos previamente expostos ao meio bucal, a quantidade de microrganismos anaeróbios obrigatórios em relação aos facultativos aumentou progressivamente com o decorrer do tempo. Deste modo, a relação de anaeróbios obrigatórios e facultativos aos 7, 90, 180 e 1060 dias foi de 1,7; 3,9; 6,5 e 11,3 respectivamente. Assim, a porcentagem de anaeróbios obrigatórios nas amostras iniciais era de 50% enquanto aos 1060 dias atingia 98%, sendo formada predominantemente por bactérias Gram-negativas.

Também, Tani-Ishi et al.¹⁰⁰, em 1994, verificaram a microbiota dos canais radiculares em dois períodos evolutivos da lesão periapical em dentes de ratos. Aos 7 e 15 dias, os anaeróbios obrigatórios aumentaram de 24,3 para 47,3% correspondendo à fase de expansão da lesão periapical. Nesta fase foi observada maior incidência de *Peptostreptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella* e *Porphyromonas*.

Estudos utilizando cultura microbiológica têm revelado que a infecção endodôntica em dentes com lesão periapical é caracterizada por uma microbiota mista composta por um número médio de três a seis espécies por canal (LANA et al.⁴⁶, 2001; LE GOFF et al.⁴⁷, 1997; PETERS et al.⁶³, 2002; SUNDQVIST⁹⁷, 1976; WITGOW JR. e SABISTON¹⁰⁸, 1975). Ocasionalmente, algo em torno de 12 espécies poderia ser isolado (SUNDQVIST⁹⁷,

1976). Casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo abrigam um número médio de duas a oito espécies por amostra (SAKAMOTO et al.⁶⁹, 2006; SUNDQVIST et al.⁹⁹, 1989; WASFY et al.¹⁰⁵, 1992). A microbiota envolvida em dentes com lesão periapical é composta, predominantemente por bactérias anaeróbias, particularmente espécies Gram-negativas pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Campylobacter*. Anaeróbios Gram-positivos dos gêneros *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Pseudoramibacter* assim como facultativos ou estreptococos microaerófilos têm sido também comumente isolados de canais radiculares primariamente infectados (LANA et al.⁴⁶, 2001; LE GOFF et al.⁴⁷, 1997; PETERS et al.⁶³ 2002; SUNDQVIST⁹⁶, 1992).

Sundqvist⁹⁶, em 1992, investigou a existência de relações comensais ou antagonistas entre microrganismos nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Foram colhidas amostras de 65 canais radiculares de dentes de humanos e estas analisadas microbiologicamente. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*, a maioria de anaeróbios estritos.

Também, Wasfy et al.¹⁰⁵ (1992) estudaram a microbiota de dentes com história de trauma em 85 pacientes, e observaram que era predominantemente anaeróbia, sendo 73% das bactérias cultiváveis. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Eubacterium* (68%), *Streptococcus morbillorum* (47%), e *bacteroides* não pigmentados.

Pelos resultados estatísticos (análise de variância), nota-se que nenhuma diferença entre as médias no número de microrganismos encontrados nos casos de necrose sem e com lesão periapical crônica foi significativa ($p > 0,05$), ainda que tenha ocorrido uma tendência

da média de logaritmo de contagem para o microrganismo anaeróbio estrito no Grupo II tender a ser maior que as outras.

Tradicionalmente, as infecções endodônticas têm sido estudadas por métodos de cultura, mas limitações nestes métodos podem prejudicar o conhecimento sobre a composição da microbiota endodôntica nos diferentes tipos de infecção. Hoje, as limitações impostas pela inabilidade em cultivar certos microrganismos, podem ser sobrepostas pelo uso de métodos moleculares de identificação.

Assim, as infecções endodônticas têm sido claramente reveladas ser mais complexas do que anteriormente demonstrado pelos métodos de cultura microbiológica. Bactérias anteriormente incultiváveis têm sido encontradas em infecções endodônticas primárias por métodos moleculares. Por isso, estima-se que um canal radicular infectado pode apresentar de 10 a 30 espécies bacterianas, e ocasionalmente chegar até a 50 espécies (SIQUEIRA JR. e RÔÇAS⁷⁷, 2005). Esses números são muito maiores do que anteriormente revelado pelos procedimentos de cultura, bem como a complexidade e a diversidade da microbiota endodôntica. Outro dado interessante obtido por estudos moleculares é que muitos patógenos endodônticos são também os principais patógenos suspeitos associados a doenças periodontais (HAFFAJEE et al.³⁷, 1997, SIQUEIRA JR. et al.^{84,85,87}, 2000, 2001, 2002).

Nossos resultados utilizando sondas específicas de 33 microrganismos revelaram uma grande variação de espécies bacterianas encontradas nos canais radiculares dos casos avaliados, com média de 15,4 espécies para a necropulpectomia I e 20,1 para os casos de necropulpectomia II. Estes resultados reforçam os dados atualmente obtidos pelos métodos que envolvem biologia molecular, os quais apontam uma maior complexidade na

microbiota endodôntica, com maior número de espécies bacterianas. Cabe ressaltar que a maior parte das espécies bacterianas avaliadas era de anaeróbios estritos.

A detecção de microrganismos em todas as amostras pela técnica de cultura microbiológica e pela técnica de *checkerboard* demonstra a presença de quantidade significativa dos microrganismos avaliados, uma vez que a técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard* permite a detecção das espécies bacterianas somente quando ocorre a presença mínima de 10^4 células.

Segundo Oliveira et al.⁶² (2002), algumas espécies como *Porphyromonas gingivalis*, um bacilo Gram-negativo, comumente isolada em infecções endodônticas, pode levar até 7 dias para apresentar crescimento satisfatório e identificação pelos métodos bacteriológicos convencionais. Por serem anaeróbios estritos, existe uma grande probabilidade de insucesso no isolamento destes microrganismos a partir de uma amostra clínica. Nossos resultados revelaram grande incidência deste microrganismo (18 dos 20 casos) para os dois grupos, quando avaliados pelo método de hibridação DNA-DNA *checkerboard*.

Jung et al.⁴² (2000) investigaram a epidemiologia de supostos patógenos presentes nos canais radiculares de dentes com periodontite apical. A metodologia utilizada fez uso de PCR e hibridação, usando sondas de oligonucleotídeos baseados em rRNA. As espécies encontradas com maior frequência foram *Fusobacterium* sp. (68,4%), seguida de *Peptostreptococcus micros* (44,7%), e *Porphyromonas gingivalis* (26,3%). Dezesesseis canais radiculares (42,1%) continham uma ou mais espécies das bactérias avaliadas. *Bacteroides forsythus* e *Treponema* sp. foram detectadas em 8 e 6 casos, respectivamente.

A técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard* permitiu a identificação de 31 espécies bacterianas diferentes nos casos de necropulpectomia I das 33 sondas utilizadas para análise, sendo encontrados em média 61,7% de microrganismos anaeróbios estritos e 38,3% de espécies bacterianas facultativas/aeróbios. Na necropulpectomia II, foram identificadas 32 espécies bacterianas diferentes das 33 sondas utilizadas para análise, sendo encontrados em média 59,52% de microrganismos anaeróbios estritos e 40,48% de espécies bacterianas facultativas/aeróbios. A média maior de espécies bacterianas anaeróbias estritas detectadas para os dois grupos pode estar relacionada à presença de maior número de sondas para detecção dos anaeróbios dentre as utilizadas para o método de hibridação DNA-DNA *checkerboard*.

Outros estudos onde a colheita foi realizada em canais radiculares de humanos, apresentaram números maiores de espécies bacterianas (SUNDE et al.⁹⁵, 2000; SIQUEIRA Jr. et al.^{81,85,87,88}, 2000, 2002; SOUZA⁹³, 2003). Em estudo de Siqueira Jr. et al.⁸⁵ (2000), o conteúdo de 28 canais radiculares de dentes de humanos foi examinado pela técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard*, onde 22 das 42 sondas utilizadas foram reativas com pelo menos uma das amostras, e o número de espécies bacterianas em cada amostra foi em média de 4,7 espécies, variando de 1 a 17. Das 28 amostras, 17 foram positivas para pelo menos uma das sondas de DNA. As espécies mais prevalentes foram *Bacteroides forsythus*, *Haemophilus aphrophilus*, *Corynebacterium matruchoti*, *Porphyromonas 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.

No grupo I, constituído por canais radiculares com necrose pulpar sem lesão periapical crônica, foram detectadas espécies de anaeróbios estritos como *Fusobacterium nucleatum ss polymorphum*, *Propionibacterium acnes I*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Treponema denticola*; e espécies de anaeróbios facultativos como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Capnocytophaga ochracea* e *Neisseria mucosa*.

As espécies encontradas com maior frequência nos casos do Grupo I foram *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum ss polymorphum* e *Porphyromonas gingivalis*, presentes em 9, 8 e 8 casos, respectivamente; e *Streptococcus gordonii* e *Treponema denticola*, detectadas em 7 casos.

Nos canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical crônica (Grupo II), foram detectadas 19 espécies de anaeróbios estritos, entre elas *Actinomyces gerencseriae*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e 11 espécies de anaeróbios facultativos, entre elas, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus oralis*.

Em 2006, Jacinto et al.³⁹ estudaram a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em canais radiculares de dentes com abscesso periapical, sendo os procedimentos laboratoriais realizados por métodos de cultura microbiológica apropriados para espécies anaeróbias. Oitenta e três por cento dos microrganismos eram anaeróbios estritos e 47,5% das bactérias isoladas eram Gram-negativas. *Porphyromonas gingivalis* foi mais freqüente em casos sintomáticos. Em nosso estudo, *P.gingivalis* foi encontrado em 80% dos casos de necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente, enquanto que nos casos com lesão, *P. gingivalis* foi detectado em 100% dos casos.

A detecção de microrganismos anaeróbios em todas as amostras dos casos de necropulpectomia I (Grupo I) pela técnica de *checkerboard* e isto não ter ocorrido na técnica de cultura, pode ser explicado pelo fato de que os métodos de cultura apresentam limitações que podem ter camuflado a presença de tais microrganismos. Hoje, as limitações impostas pela inabilidade em cultivar certos microrganismos na técnica de cultura, podem ser sobrepostas pelo uso de métodos moleculares de identificação. Ainda, a porcentagem de anaeróbios estritos, tanto nos casos de necropulpectomia I como nos casos de necropulpectomia II, foi maior que na técnica de cultura, por a técnica de *checkerboard* ter investigado predominantemente mais sondas de anaeróbios do que aeróbios e facultativos neste estudo.

Das 33 espécies de microrganismos diferentes avaliados neste estudo, 26 estiveram presentes em um maior número de canais radiculares nos casos de necropulpectomia II (Grupo II); 4 espécies diferentes mantiveram-se iguais em número de presença nos casos de necropulpectomia I e II; 2 espécies diferentes apresentaram-se em maior número nos casos de necropulpectomia I; e uma espécie, *Selenomonas noxia* (ATCC 43541) não foi detectada em nenhum canal radicular, nos casos de necropulpectomia I e II.

Foram detectadas 32 sondas positivas nos canais radiculares dos casos de necropulpectomia II (Grupo II), sendo identificadas de 3 a 19 espécies bacterianas anaeróbias por amostra, e de 2 a 12 espécies bacterianas aeróbias/facultativas por amostra. Já na necropulpectomia I (Grupo I), das 33 sondas utilizadas, 31 foram positivas, sendo identificadas de 1 a 19 espécies bacterianas anaeróbias por amostra, e de 0 a 11 espécies bacterianas aeróbias/facultativas por amostra. Dos 20 canais radiculares avaliados, todos apresentaram evidência de sinal positivo para pelo menos

uma sonda. Do total de amostras, 11 canais radiculares apresentaram 21 ou mais espécies bacterianas diferentes e 9 apresentaram menos que 20 espécies por canal radicular.

Nos canais radiculares com necrose pulpar sem lesão periapical crônica (Grupo I), as espécies encontradas com maior frequência foram anaeróbias como *Prevotella melaninogenica* (90%), *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum* (80%), *Porphyromonas gingivalis* (80%), *Treponema denticola* (70%), *Propionibacterium acnes I* (60%), e facultativas como *Streptococcus gordonii* (70%). Por outro lado, duas sondas de espécies facultativas não foram detectadas em nenhuma das amostras deste grupo (*Streptococcus mitis* e *Selenomonas noxia*).

Já nos casos de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical crônica (Grupo II), três sondas analisadas estiveram presentes em 100% dos canais radiculares, sendo duas delas anaeróbias como *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum*, e *Porphyromonas gingivalis*, e uma delas facultativa como *Neisseria mucosa*. Uma sonda facultativa não foi detectada em nenhuma das amostras deste grupo (*Selenomonas noxia*).

Um canal radicular pertencente ao Grupo II (Necropulpectomia II) apresentou o menor número de espécies investigadas neste grupo, três microrganismos anaeróbios e dois microrganismos aeróbios/facultativos. No Grupo I (Necropulpectomia I), duas amostras não apresentaram microrganismos aeróbios/facultativos.

Os métodos moleculares de identificação de microrganismos têm ampliado o papel de espécies bacterianas nas doenças perirradiculares e têm também expandido a lista de supostos patógenos endodônticos por detectar espécies de difícil ou até mesmo impossível cultivo. Como conseqüência, a microbiota endodôntica tem sido claramente redefinida pela biologia molecular.

Os resultados deste estudo da microbiota dos canais radiculares confirmam o caráter polimicrobiano da infecção endodôntica e a necessidade de mais estudos utilizando métodos de biologia molecular associados à cultura microbiológica, na tentativa de melhor compreender a microbiota endodôntica, especificar seu papel na patogênese das doenças perirradiculares e estabelecer estratégias para seu combate durante o tratamento endodôntico.

7 Conclusão

De acordo com a metodologia empregada neste estudo podemos concluir que:

1. Nos casos de necrose pulpar com e sem lesão periapical visível radiograficamente, a infecção endodôntica é polimicrobiana, com presença de microrganismos aeróbios, facultativos e anaeróbios estritos, de acordo com o método de cultura microbiológica.
2. Houve tendência para maior presença de bactérias anaeróbias estritas nos casos de necropulpectomia II, embora sem diferença significativa, em relação aos casos de necropulpectomia I, de acordo com o método de cultura microbiológica.
3. Foi possível observar grande número de espécies bacterianas nos canais radiculares, com média de 15,4 espécies para a necropulpectomia I e 20,1 para os casos de necropulpectomia II de acordo com a técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard*.
4. Foi observada grande freqüência de espécies bacterianas anaeróbias estritas nos canais radiculares, para os casos de necropulpectomia I e necropulpectomia II de acordo com a técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard*.

8 Referências*

- 1- ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 39-47, Jan. 1998.
- 2- ANDO, N.; HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 23, n.1. p. 20-27, Jan. 1990.
- 3- ASSED, S.; ITO, I. Y.; LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; LOPATIN, D. E. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 12, n. 2, p. 66-69, Apr. 1996.
- 4- BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.
- 5- BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER Jr., W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.17, n. 8, p. 380-383, Aug. 1991.
- 6- BERG, J. O.; NORD, C. E. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 81, n. 2, p. 163-166, Feb. 1973.
- 7- BOGEN, G.; SLOTS, J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 204-210, May 1999.
- 8- BONIFÁCIO, K. C. **MEV – Avaliação do ápice radicular em dentes de humanos com e sem vitalidade pulpar.** 2000. 169f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR-6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

- 9- 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.**, St. Louis, v. 10, n. 10, p. 1094-1099, Oct. 1957.
- 10- BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int Endod J.**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 35-40, Jan. 1985.
- 11- BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 55, n. 3, p. 307-312, Mar. 1983.
- 12- BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, n. 4, p. 321-328, Aug. 1981.
- 13- BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 1, n. 5, p. 170-175, Oct. 1985.
- 14- BYSTROM, A.; HAPPONEN, R. P.; SJOGREN, U.; SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 3, n. 2, p. 58-63, Apr. 1987.
- 15- CHÁVEZ DE PAZ, L. E.; DAHLÉN, G.; MOLANDER, A.; MÖLLER, Ä.; BERGENHOLTZ, G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 500-508, July 2003.

- 16- COLOMBO, A. P. V.; TELES, R. P.; TORRES, M. C.; SOUTO, R.; ROSALÉM Jr., W.; MENDES, M. C. S.; UZEDA, M. Subgingival microbiota of brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 4, p. 360-369, Apr. 2002.
- 17- CONRADS, G.; GHARBIA, S. E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H. N. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. **J. Endod.**, Chicago, v. 23, n. 7, p. 433-437, July 1997.
- 18- DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G. R. Endodontic activity in teeth with necrotic pulps. **J. Dent. Res.**, Oklahoma, v. 59, n. 6, p. 1033-1040, June 1980.
- 19- DOUGHERTY, W. J.; BAE, K. S.; WATKINS, B. J.; BAUMGARTNER, J. C. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v. 24, n. 5, p. 356-58, May 1998.
- 20- DRUCKER, D. B.; GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D. Role of anaerobic species in endodontic infection. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 25, n. 2, p. 220-221, Sept. 1997.
- 21- EGAN, M. W.; SPRATT, D. A.; NG, Y.-L.; LAM, J. M.; MOLES, D. R.; GULABIVALA, K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with periapical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 321-329, Apr. 2002.
- 22- FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; OHMAN, A. E.; MOLLER, A. J. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, n. 2, p. 134-144, Apr. 1982.

- 23- 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.**, Oxford, v. 38, n. 6, p.372-380, June 2005.
- 24- FOSCHI, F.; CAVRINI, F.; MONTEBUGNOLI, L.; STASHENKO, P.; SAMBRI, V.; PRATI, C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 20, n. 5, p. 289-295, Oct. 2005.
- 25- FUKUSHIMA, H.; YAMAMOTO, K.; HIROHATA, K.; SAGAWA, H.; LEUNG, K. P.; WALKER, C. B. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. **J. Endod.**, Chicago, v. 16, n. 11, p. 534-538, Nov. 1990.
- 26- GATTI, J. J.; DOBECK, J. M.; SMITH, C.; WHITE, R. R.; SOCRANSKY, S. S.; SKOBE, Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 197-204, Oct. 2000.
- 27- GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 291-298, Nov. 1994.
- 28- GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. **Microbios**, Cambridge, v. 80, n. 325, p. 231-243, 1994.
- 29- GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 69-75, Mar. 1996.

- 30- GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. **J. Dent.**, Bristol, v. 24, n. 1/2, p. 47-55, Jan./Mar. 1996.
- 31- GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 235-241, July 1996.
- 32- GOMES, B. P. F. A.; PINHEIRO, E. T.; GADE-NETO, C. R.; SOUZA, E. L. R.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 71-76, Apr. 2004.
- 33- GONÇALVES, R. B.; MOUTON, C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v. 25, n. 5, p. 336-340, May 1999.
- 34- GONÇALVES, R. B.; ROBITAILLE, M.; MOUTON, C. Identical clonal types of *Porphyromonas gingivalis* ou *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 197-200, June 1999.
- 35- HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubule. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 66, n. 8, p. 1375-1379, Aug. 1981.
- 36- HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiologic agents of destructive periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, p. 78-111, 1994.
- 37- HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT JR., R. L.; SOCRANSKY, S. S. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, p. 324-334, 1997.

- 38- HASHIOKA, K.; YAMASAKI, M.; NAKANE, A.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, n. 11, p. 558-561, Nov. 1992.
- 39- JACINTO, R. C.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. 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.**, Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 285-292, Oct. 2003.
- 40- JACINTO, R. C.; GOMES, B. P. F.A.; SHAH, H. N.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 62-70, Jan. 2006.
- 41- JUNG, I. Y.; CHOI, B. K.; KUM, K. Y.; YOO, Y. J.; YOON, T. C.; LEE, S. J.; LEE, C. Y. 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.**, St. Louis, v. 92, n. 3, p. 329-334, Sept. 2001.
- 42- JUNG, I. Y.; CHOI, B. K.; JUNG, I. Y.; CHOI, B. K.; KUM, K. Y.; ROH, B. D.; LEE, S. J.; LEE, C. Y.; PARK, D. P. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **J. Endod.**, Chicago, v. 26, n. 10, p. 599-604, Oct. 2000.
- 43- 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.**, St. Louis, v. 20, n. 3, p. 340-349, Sept. 1965.

- 44- 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.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 91-96, Jan. 1974.
- 45- KEUDELL, K.; CONTE, M.; FUJIMOTO, L.; ERNEST, M.; BERRY, H. G. Microorganisms isolated from pulp chambers. **J. Endod.**, Chicago, v. 2, n. 5, p. 146-148, May 1976.
- 46- LANA, M. A.; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P.; STEHLING, R.; GARCIA, G. D.; SILVA, B. K. C.; HAMDAN, J. S.; NICOLI, J. R.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, M. L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 16, n. 2, p. 100-105, Apr. 2001.
- 47- LE GOFF, A.; BUNETEL, L.; MOUTON, C.; BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 12, n. 5, p. 318-322, Oct. 1997.
- 48- LEONARDO, M. R. **Endodontia**: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas, 2005. 1451p.
- 49- LEONARDO, M. R.; ROSSI, M. A.; SILVA, L. A.; ITO, I. Y.; BONIFÁCIO, K. C. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J. Endod.**, Chicago, v. 28, n. 12, p. 815-818, Dec. 2002.
- 50- LOESCHE, W. J.; LOPATIN, D. E.; STOLL, J.; van POPERIN, N.; HUJOEL, P. P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard?. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 2, p. 418-426, Feb. 1992.

- 51- MELVILLE T. H.; BIRCH, R. H. Root canal and periapical floras of infected teeth. **Oral Surg.**, St. Louis, v. 23, n. 1, p. 93-98, Jan. 1967.
- 52- MILLER, W. D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 36, n. 7, p. 505-528, July 1894.
- 53- MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with periapical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan. 1998.
- 54- MOLLER, A. J.; FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; OHMAN, A. E.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, n. 6, p. 474-486, Dec. 1981.
- 55- MOORE, W. E.; MOORE, L. V. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, p. 66-77, 1994.
- 56- MORAES, S. R.; SIQUEIRA JR., J. F.; COLOMBO, A. P.; ROÇAS, I. S.; DOMINGUES, R. 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.**, Chicago, v. 28, n. 2, p. 86-89, Feb. 2002.
- 57- MORSE, D. R. The endodontic culture technique: an impractical and unnecessary procedure. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 793-806, Oct. 1971.
- 58- MUNSON, M. A.; PITT FORD, T.; CHONG, B.; WEIGHTMAN, A.; WADE, W. G. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 81, n.11, p. 761-766, Nov. 2002.
- 59- 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.

- 60- NAIR, P. N. R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K-E.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J. Endod.**, Baltimore, v. 16, n. 12, p. 580-588, Dec. 1990.
- 61- NG, Y.; SPRATT, D.; SRISKANTHARAJAH, S.; GULABIVALA, K. Evaluation of protocols for filed decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 5, p. 317-320, May 2003.
- 62- OLIVEIRA, J. C. M.; SIQUEIRA JR., J. F.; ALVES, G. B.; HIRATA JR., R.; ANDRADE, A. F. B. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.12, p.729-732, Dec 2000.
- 63- 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.
- 64- PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; BUIJS, J. F.; van WINKELHOFF, A. J. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 76-81, Feb. 2001.
- 65- RIBEIRO, F. C.; CONSOLARO, A. Bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma apical. **Rev. Dent. Press. Biol. Oral**, Bauru, v. 1, n. 1, jan./abr. 2000. 1 CD-ROM.
- 66- RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr., J. F.; SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, n. 5, p. 315-320, May 2004.

- 67-RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr., J.F.; ANDRADE, A. F. B.; UZEDA, M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 20-26, Jan. 2003.
- 68-RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr., J. F.; SANTOS, K. R. N.; COELHO, A. M. A. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 91, n. 4, p. 468-471, Apr. 2001.
- 69-SAKAMOTO, M.; RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr., J. F.; BENNO, Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 21, n. 2, p. 112-122, Apr. 2006.
- 70-SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 104-109, Feb. 2006.
- 71-SEOL, J. H.; CHO, B. H.; CHUNG, C.P.; BAE, K. S. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 110-114, Feb. 2006.
- 72-SHOVELTON, D. S. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. **Br. Dent. J.**, London, v. 117, n. 3, p. 101-107, Aug. 1964.
- 73-SIQUEIRA Jr., J. F. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 10, p. 619-623, Oct. 2003.
- 74-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.**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 216-220, Apr. 2001.

- 75- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 6, p. 390-393, June 2003.
- 76- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 174-180, Mar. 2003.
- 77- SIQUEIRA Jr, J. F.; ROÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. **J. Endod.**, Chicago, v. 31, n. 7, p. 488-498, July 2005.
- 78- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 11, p. 735-738, Nov. 2003.
- 79- SIQUEIRA Jr., J.F.; RÔÇAS, I. N. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 4, p. 244-247, Apr. 2003.
- 80- SIQUEIRA Jr, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 97, n. 5, p. 632-641, May 2004.
- 81- SIQUEIRA Jr, J. F.; ROÇAS, I. N.; LOPES, H. P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 93, n. 2, p. 174-178, Feb. 2002.
- 82- SIQUEIRA Jr, J. F.; JUNG, I. Y.; ROÇAS, I.N.; LEE, C. Y. 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.**, St. Louis, v. 99, n. 5, p. 641-647, Jan. 2005.

- 83- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N.; ANDRADE, A. F. B.; UZEDA, M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 2, p. 111-113, Feb. 2003.
- 84- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N.; OLIVEIRA, J. C.; SANTOS, K. R. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Chicago, v. 27, n. 9, p. 563-566, Sept. 2001.
- 85- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 89, n. 6, p. 744-748, June 2000.
- 86- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. V. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 92, n. 4, p. 451-457, Oct. 2001.
- 87- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. *Actinomyces* species, Streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. **J. Endod.**, Chicago, v. 28, n. 3, p. 168-172, Mar. 2002.
- 88- SIQUEIRA Jr., J. F.; ROÇAS, I. N.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P.; SANTOS, K. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 51, n. 12, p. 1090-1096, Dec. 2002.
- 89- SOCRANSKY, S. S.; McDONALD, J. B.; SAWYER, S. The cultivation of *Treponema microdentium* as surface colonies. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 171-172, Oct. 1959.

- 90-SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; LEVIN, A. E. “Checkerboard” DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, Natick, v. 17, n. 4, p. 788-892, Oct. 1994.
- 91-SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; SMITH, C.; MARTIN, L.; HAFFAJEE, A. D.; UZEL, N. G.; GOODSON, J. M. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, n. 6, p. 352-362, Dec. 2004.
- 92-SOUSA, E. L. R.; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. A.; PINHEIRO, E. T.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 96, n. 3, p. 332-339, Sept. 2003.
- 93-SOUZA, C. A. S. **Hidróxido de cálcio como medicação intracanal na terapia endodôntica:** avaliação microbiológica pela técnica de biologia molecular “checkerboard DNA-DNA hybridization”. 2003. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- 94- SOUZA, C. A . S.; TELES, R. P.; SOUTO, R.; CHAVES, M. A. E.; COLOMBO, A. P. V. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiological evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. **J. Endod.**, Chicago, v. 31, n. 2, p. 79-83, Feb. 2005.
- 95-SUNDE, P. T.; TRONSTAD, L.; ERIBE, E. R.; LIND, P. O.; OLSEN, I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 191-196, Oct. 2000.

- 96-SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, n. 5, p. 257-262, Oct. 1992.
- 97-SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Tese (PhD) – Universidade de Umea, Suécia, 1976.
- 98- SUNDQVIST, G.; REUTERVING, C. O. Isolation of *Actinomyces israeli* from periapical lesion. **J. Endod.**, Chicago, v. 6, n. 6, p. 602-606, June 1980.
- 99-SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **J. Endod.**, Chicago, v. 15, n. 1, p. 13-19, Jan. 1989.
- 100-TANI-ISHII, N.; WANG, C-Y.; TANNER, A.; STASHENKO, P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.3, p.129-135, June 1994.
- 101-TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; RISO, K.; SLOTS, J. Extraradicular endodontic infections. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 3, n. 2, p. 86-90, Apr. 1987.
- 102-VAFAIE, N. M. DNA analyses of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. **J. Endod.**, Chicago, v. 25, p. 290, 1999.
- 103-VIGIL, J. V.; WAYMAN, B. E.; DAZEY, S. E.; FOWLER, C. B.; BRADLEY, D. V. Identification and antibiotics sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. **J. Endod.**, Chicago, v. 23, n. 2, p. 110-114, Feb. 1997.
- 104-WALTIMO, T. M. T.; SIRÉN, E. K.; TORKKO, H. L. K.; OLSEN, I.; HAAPSALO, M. P. P. Fungi in therapy resistant apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 96-101, Mar. 1997.

- 105-WASFY, M. O.; McMAHON, K. T.; MINAH, G. A.; FALKLER JR., W. A. Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 100-105, Apr. 1992.
- 106-WAYMAN, B. E.; MURATA, S. M.; ALMEIDA, R. J.; FOWLER, C. B. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, n. 4, p. 152-155, Apr. 1992.
- 107-WINKLER, K. C.; VAN AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 12, n. 7, p. 857-875, July 1959.
- 108-WITTEGOW JR., W. C.; SABISTON, C. B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J. Endod.**, Chicago, v. 1, n. 15, p. 168-171, May 1975.
- 109-XIA, T.; BAUGARTNER, J. C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 9, p. 549-552, Oct. 2003.
- 110-XIA, T.; BAUGARTNER, J. C.; DAVID, L. L. Isolation and identification of *Prevotella tannarae* from endodontic infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 15, n. 4, p. 273-275, Aug. 2000.
- 111-ZAVISTOSKI, J.; DZINK, J.; ONDERDONK, A.; BARLETT, J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. **Oral Surg.**, St. Louis, v. 49, n. 2, p. 171-174, Feb. 1980.

Anexo

Anexo A1 – Composição dos Meios de Cultura**Ágar Sangue (As)****Tryptic Soy Agar (Difco) – Tsa**

Digesto pancreático de caseína.....	15,0g
Digesto enzimático de soja	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Ágar	15,0g
Água destilada -----	1000,0mL

Ágar Sangue enriquecido com Menadiona e Hemina (AsK)**Tryptic Soy Agar (Difco) - TSa**

Digesto pancreático de caseína.....	15,0g
Digesto enzimático de soja	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Ágar	15,0g
Água destilada -----	1000,0mL

Tioglicolato de Sódio sem Indicador e sem Glicose (Tio's)

Extrato de levedura	5,0g
Casitone	15,0g
Cistina - L	0,25g
Cloreto de sódio	2,5g
Ácido tioglicólico	0,3mL
Ágar	0,75g

RODRIGUES, V. M. T. **Detecção da microbiota endodôntica de dentes sem vitalidade pulpar com ou sem lesão periapical radiográfica por meio das técnicas de Checkerboard DNA-DNA Hybridization e cultura microbiológica.** 2006. 109f. Dissertação (mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

Resumo

A proposta do estudo foi avaliar a microbiota endodôntica de dentes de humanos sem vitalidade pulpar com ou sem lesão periapical visível radiograficamente por meio das técnicas de “Checkerboard DNA-DNA Hybridization” e cultura microbiológica. Foram utilizados 20 dentes unirradiculados, divididos em casos de necrose pulpar sem lesão periapical (Grupo I) e dentes com necrose pulpar e lesão periapical (Grupo II). A colheita do material do canal radicular foi realizada com lima K e cones de papel absorvente. Para a técnica de cultura, as amostras foram semeadas em meios As, Ask, Ms e Tio’s, para avaliação da presença de microrganismos anaeróbios, aeróbios e facultativos. Para a técnica de “Checkerboard DNA-DNA Hybridization”, foi realizado o processamento do DNA extraído das amostras e das sondas de DNA de 33 microrganismos. Os resultados mostraram nas duas técnicas empregadas a presença de microrganismos. A técnica de hibridação DNA – DNA *checkerboard* permitiu a identificação de 31 espécies diferentes no Grupo I e de 32 espécies diferentes no Grupo II. *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum* (80%), *Porphyromonas gingivalis* (80%), *Prevotella melaninogenica* (90%) predominaram no Grupo I. As sondas *Streptococcus mitis* e *Selenomonas noxia* não foram detectadas em nenhuma amostra deste grupo. No Grupo II, *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum*, *Neisseria mucosa* e *Porphyromonas gingivalis* foram detectadas em todos os casos e *Selenomonas noxia* não foi encontrada em nenhuma das amostras deste grupo. Houve tendência para maior presença de bactérias anaeróbias obrigatórias moderadas no Grupo II, embora sem diferença significativa ($p>0,05$), em relação ao Grupo I, de acordo com a cultura microbiológica. Foi observada maior frequência de espécies bacterianas anaeróbias obrigatórias moderadas nos canais radiculares, tanto para o Grupo I como para o Grupo II, de acordo com a técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard*.

Palavras-chave: Endodontia; bactérias; técnicas microbiológicas; biologia molecular; cavidade da polpa dentária

RODRIGUES, V. M. T. **Detection of endodontic microflora from teeth with no pulp vitality with or without radiographic periapical lesion through the checkerboard DNA-DNA hybridization and microbiological culture techniques.** 2006. 109f. Dissertação (mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the endodontic microbiota from human's teeth, with no pulp vitality, with or without radiographic chronic periapical lesion, using a culture microbiologic method and checkerboard DNA-DNA hybridization technique. The whole sample, with 20 single root's teeth, was collected and divided into: teeth with no pulp vitality without periapical lesion (Group I) and teeth with no pulp vitality with periapical lesion (Group II). The samples were obtained with K file and absorbent paper points. To the culture technique, the samples were grown by using media like As, Ask, Ms and Tio's. To checkerboard DNA-DNA hybridization technique, the samples of DNA extracted crossed with microorganisms' DNA obtained from ATCC. The results demonstrated in two techniques used that in all the samples identified microorganisms, at least 20 ufc/ml. The checkerboard DNA-DNA hybridization technique demonstrated the identification of 31 different species of microorganisms in Group I and 32 different species of microorganisms in Group II. *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum* (80%), *Porphyromonas gingivalis* (80%), *Prevotella melaninogenica* (90%) predominated in Group I. The probes *Streptococcus mitis* and *Selenomonas noxia* were not detected in no sample in this group. At Group II, *Fusobacterium nucleatum* spp *polymorphum*, *Neisseria mucosa* and *Porphyromonas gingivalis* were detected in all cases, and *Selenomonas noxia* was not present in sample of this group. It was tendency to greater number strict anaerobe microorganisms in Group II, however without statistical significance ($p>0.05$), in relation Group I, in accord with culture microbiologic method. It was detected a greater frequency of anaerobe strict microorganisms species in root canal, in both Groups I and II, in accord with the checkerboard DNA-DNA hybridization technique.

Keywords: Endodontic; bacteria; microbiologic technique; molecular biology; dental pulp cavity.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Araraquara, 26 de setembro de 2006.

VIVIAN MARIA TELLAROLI RODRIGUES