



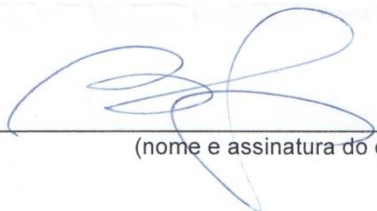
ANEXO 2

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Rafaela Capela RA 105584
esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso
intitulado avaliação da função e suscetibilidade do xeromero no ano de 2013.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de
Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de
Conclusão de Curso.

Piracicaba 23 de setembro de 2013.

x 
(nome e assinatura do orientador)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Rafaela Casadei Chapola

Avaliação da presença e suscetibilidade de *Treponema* spp. ao preparo químico-mecânico de canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesão endo-perio

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, como Trabalho de Conclusão Curso de Graduação de Odontologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Brenda Paula F. A. Gomes.

Co-orientadores: Tiago Pereira da Rosa, Letícia Maria Menezes Nóbrega.

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Rafaela Casadei Chapola

Avaliação da presença e suscetibilidade de *Treponema* spp. ao preparo químico-mecânico de canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesão endo-perio

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, como Trabalho de Conclusão Curso de Graduação de Odontologia.

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

C367a Chapola, Rafaela Casadei, 1992-
Avaliação da presença e suscetibilidade de
Treponemas spp. ao preparo químico-mecânico de
canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com
lesão endo-perio / Rafaela Casadei Chapola. --
Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida
Gomes.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Treponema. 3. Reação em cadeia
da polimerase. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de
Almeida, 1961- II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista aos meus pais, Roberto e Maria Angélica, minhas joias preciosas, pelo amor imensurável. Nós estamos para sempre juntos...

Ao meu irmão e eterno companheiro, Ricardo. Eu te amo.

Aos meus avôs, Antônio Casadei e Antônio Chapola. Espero o dia em que nós possamos nos abraçar novamente...

“O essencial é invisível aos olhos.”

Saint Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus, pela mais bela das dádivas: a vida!

Aos meus pais, Roberto e Maria Angélica, sem vocês nada teria sentido...

Ao meu irmão, Ricardo, que sempre transborda meu coração de alegria...

Ao meu grande e verdadeiro amigo Milton Buzon. “O que importa é quem você tem na vida...” Nossa amizade é eterna.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior e do diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

À minha Orientadora Profa. Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança e atenção em mim depositados.

Ao meu co-orientador, Tiago Pereira da Rosa, pelo exemplo de dedicação, perseverança, força e determinação.

À minha co-orientadora, Leticia M M Nóbrega, pelos momentos que passamos juntas.

Aos amigos funcionários, Edna Maria Muniz Cosmo, Sirlei Maria Silva Ferezine, Elisangela Barbosa Vendemiatti, Madalena Maria Barbosa, Kátia Cristina Lourenço Diaz, Luis Cláudio Nehring, Edson Roberto Feliciano, Janaina Oliveira Leite, Daiane de Fátima Pires, Marco Antonio Rapetti, Paulo Alcarde, Nilmes Muniz Rodrigues Gomes. Em especial, Mauro Augusto Barboza Dias, pessoa que tenho muito respeito, consideração e carinho. Obrigada a todos pela presteza e dedicação a nós ofertadas.

Ao Prof. Dr. Pablo Augustin Vargas, Coordenador do Curso de Graduação.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, Coordenador Associado do Curso de Graduação.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, Coordenador da Comissão da Área Básica-Biológica.

Ao Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, Coordenador da Comissão da Área de Pré-Clínica.

Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Mialhe, Coordenador da Comissão da Área Social.

Ao Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Coordenador da Comissão da Área Clínica.

À todos os Professores, pelos ensinamentos e paciência ofertados.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos. Dos momentos bons, nós os tornamos únicos. Nos momentos ruins, nós conseguimos enxergar a Luz. Que nosso laço jamais se desfaça...

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.”

Saint Exupéry

RESUMO

A cavidade pulpar e o periodonto são estruturas anatomicamente distintas, porém intimamente relacionadas, anatômica e funcionalmente. Essa inter-relação entre endodonto e o periodonto se justifica, devido à existência de vias de comunicação entre os dois ambientes: forame apical, canais laterais e túbulos dentinários. Diante dessas comunicações, trocas de agentes nocivos podem representar um fator importante na etiopatogenia de lesões endo-periodontais. *Treponema* spp é frequentemente encontrado em biofilmes subgengivais de pacientes portadores de periodontites e vem se mostrando um importante patógeno endodôntico. Porém, ele é pouco encontrado em canais radiculares pelas técnicas tradicionais. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar, através de métodos moleculares, a presença de espécies de treponemas em dentes portadores de lesões endo-perio e avaliar a susceptibilidade dessas espécies ao preparo químico mecânico, utilizando a clorexidina gel 2% como substância química auxiliar. Foram utilizadas amostras pareadas do canal radicular infectado (RC) e da bolsa periodontal (BP) coletadas de 14 pacientes e armazenadas em – 80°C para futuras análises. Depois, o DNA de cada amostra foi extraído e processado pelo método molecular de Nested-PCR, utilizando primers específicos para 8 espécies de treponemas (*T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum*). Os resultados das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e os dados, tabulados e estatisticamente analisados pelo programa SPSS for Windows. Nas amostras iniciais, foram identificados *Treponema* spp. em 92,86% (CR 13/14; BP 13/14) dos casos. As espécies mais frequentemente detectadas foram *T. denticola* (CR 10/14; BP 15/20). *T. maltophilum* (CR, 10/14; BP, 12/14); *T. socranskii* (CR, 7/14; BP, 8/14) e *T. medium* (CR 6/14; BP, 7/14). Após o preparo químico-mecânico, pode-se observar a redução significativa do número de espécies encontradas nos canais radiculares, porém essa redução não se mostrou significativa na bolsa periodontal. Nenhuma correlação positiva foi encontrada para a presença simultânea das espécies no canal radicular e bolsa periodontal. Associações positivas foram observadas entre *T. socranskii* e *T. medium*

($p=0,003$). A sensibilidade à palpação mostrou-se associada à presença de *T. medium* nos canais radiculares e à *T. amylovorum* na bolsa periodontal ($p=0,031$). *T. medium* nos canais radiculares estava também associado à sensibilidade a percussão ($p=0,023$). Conclui-se que a alta prevalência de *Treponema* spp. encontrada nos canais radiculares e bolsas periodontais indica que treponemas são importantes patógenos na comunidade microbiana de dentes com lesão endo-perio., Apesar do preparo químico-mecânico promover significativa redução dos níveis de treponemas nos canais radiculares, ele foi ineficaz em reduzi-los nas bolsas periodontais de dentes portadores de lesão endo-periodontal.

Palavras-Chave: Treponema, PCR, endodontia

ABSTRACT

The pulp cavity and periodontal structures are anatomically distinct but closely related anatomically and functionally. The interrelationship between periodonto and endodonto is justified by the existence of communication links between these two environments such as the: apical foramen, lateral canals and dentinal tubules. Due to these communications, exchanges of harmful agents may represent an important factor in the pathogenesis of endo-periodontal injuries. *Treponema* spp is present in subgingival biofilms of patients with periodontitis and has proved to be an important endodontic pathogen. However, it is hardly found in root canals by traditional techniques. Thus, the aim of this study was to investigate, using molecular methods, the presence of *Treponema* species in teeth with perio-endo lesions and to evaluate the susceptibility of these species to the chemo-mechanical preparation, using 2% chlorhexidine gel as auxiliary chemical substance. Paired samples from infected root canals (RC) and periodontal pocket (BP) were collected from 14 patients and stored in -80°C. Afterwards, the DNA from each sample was extracted and processed by the molecular method nested PCR, using specific primers for eight species treponemas (*T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* and *T. lecithinolyticum*). The results of the reactions were analyzed by agarose gel electrophoresis, and the data were tabulated and statistically analyzed using SPSS for Windows. In the initial samples *Treponema* spp. was identified in 92.86% (CR 13/14, BP 13/14) of cases. The species most frequently detected were *T.denticola* (CR 10/14, BP 15/20); *T. maltophilum* (CR, 10/14, BP 12/14); *T. socranskii* (CR, 7/14, BP, 8/14); *T. medium* (CR 6/14; BP, 7/14). After chemo-mechanical preparation a significant reduction in the number of species found in root canals was observed, but this reduction was not significant in the periodontal pocket. No positive correlation was found for the simultaneous presence of the species in the root canal and periodontal pocket. Positive associations were observed between *T. socranskii* and *T. medium* ($p = 0.003$). The tenderness was associated with the presence of *T. medium* in the root canals and *T.*

amylovorum in periodontal pockets ($p=0.031$). *T. medium* in the root canals was also associated with sensitivity to percussion ($p = 0.023$). It was concluded that the high prevalence of *Treponema* spp. found in root canals and periodontal pockets indicates that they are important pathogens in the microbial community of teeth with endo-perio lesion. Moreover, even though the chemo-mechanical preparation was able to promote a significant reduction of treponemas in the root canals, it was ineffective in reducing them. in periodontal pockets of teeth with endo-periodontal lesions.

Keywords: Treponema, PCR, endodontics

ÍNDICE

1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura	16
3. Proposição	24
4. Materiais e Métodos	25
5. Resultados	33
6. Discussão	43
7. Conclusões	47
8. Referências	48

ANEXO 1- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

ANEXO 2 - Cópia do parecer de aprovação do Relatório Parcial de Iniciação Científica.

1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária e o periodonto são duas estruturas anatomicamente distintas, porém inter-relacionadas funcionalmente, visto que ambas as estruturas têm a mesma origem embriológica e formação concomitante (Chilton, 1972). Anatomicamente, existem 3 vias de comunicação entre o espaço pulpar e o periodonto: forame apical, ramificações do canal principal e túbulos dentinários, sendo o forame apical a via de comunicação mais importante. Dessa forma pode haver troca de agentes nocivos, fator importante na etiopatogenia das lesões endo-periodontais combinadas (necrose pulpar e doença periodontal).

A literatura confirma a capacidade da doença pulpar iniciar e perpetuar uma alteração periodontal. Recentes publicações sugerem que a doença periodontal é uma causa direta de atrofia e necrose pulpar. A hipótese da doença periodontal resultar em necrose pulpar é menos freqüente que o contrário e depende da severidade da doença periodontal, presença de canais laterais e história de tratamento periodontal neste dente.

Sabendo que os microrganismos são os principais responsáveis pela instalação e manutenção de doenças pulpares e periodontais, é de fundamental importância identificar os microrganismos presentes e investigar possíveis interações entre alguns grupos de espécies, que podem ser relevantes na etiopatogenia e manutenção dessas patologias (Molander *et al.* 1998; Pinheiro *et al.*, 2003; Montagner *et al.*, 2010).

Com os avanços tecnológicos e aplicação de metodologias da biologia molecular para diagnóstico e identificação de microrganismos foi possível expandir o conhecimento sobre a microbiota oral e endodôntica (Gomes & Montagner, 2010). O

Nested-PCR é uma variação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) simples, bastante sensível, que consiste na realização de reações de amplificação subsequentes com 2 conjuntos de primers. A primeira reação é feita com primers universais para amplificar todo o gene 16S rRNA das bactérias presentes, à partir do DNA extraído das amostras. O produto desta reação é submetido a uma segunda reação de amplificação, utilizando primers espécie-específicos, que irão se anelar a uma sequência interna do primeiro fragmento gerado pela reação universal (Willis *et al.*, 1999; Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes & Montagner, 2010). A grande vantagem dos métodos moleculares é a detecção e identificação de bactérias anaeróbias de difícil cultivo.

Treponema spp. são microrganismos gram-negativos, espiralados e fastidiosos, ou seja, muito exigentes em relação ao requerimento nutricional, são também bastante sensíveis ao oxigênio (anaeróbio estrito), assim sendo, seu cultivo é extremamente difícil, bem como a diferenciação em nível de espécie. Outra característica do gênero é a presença de flagelos, o que lhes confere intensa motilidade. A melhor caracterização das espécies passou a ser possível com base na análise do DNA, através de metodologias moleculares (Fenno e McBride, 1998; Chan e McLaughlin, 2000; Sakamoto *et al.*, 2009). Devido à limitação dos métodos cultura-dependentes, estudos utilizando métodos moleculares se tornaram de eleição na avaliação da prevalência e do papel dos *Treponema* spp. nas infecções endodônticas e periodontais (Willis *et al.*, 1999).

O envolvimento de várias espécies de treponemas com problemas periodontais e sua virulência nessa patologia são discutidos na literatura. Os componentes deste gênero podem representar cerca de 50% da microbiota encontrada em biofilme subgingival de pacientes portadores de periodontite (Wyss *et al.*, 1996; Umemoto *et al.*, 1997; Fenno e McBride, 1998; Chan e McLaughlin, 2000). Embora muitos patógenos periodontais sejam frequentemente isolados em infecções endodônticas (Siqueira-Junior *et al.*, 2000; Roças *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006), pouco se conhece da

prevalência de *Treponemas spp.* nas infecções endodônticas e da susceptibilidade dessas espécies ao preparo químico-mecânico.

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi verificar a capacidade do preparo químico mecânico em reduzir *Treponema spp.* nos canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesão endo-periodontal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os tecidos pulpare e periodontais são componentes que permitem que um dente desempenhe suas funções na cavidade oral. Sua origem embriológica comum permitiu o estabelecimento de uma íntima relação entre esses tecidos (Christie & Holthuis, 1990), na qual diversas vias anatômicas, tais como o forame apical, canais laterais e acessórios (Seltzer *et al.*, 1963) constituem em um possível caminho para que bactérias e toxinas (Santiago & Fonseca, 1983; Solomon *et al.*, 1995; Carrote, 2004), provenientes de um processo patológico em um tecido atinjam o outro de forma consecutiva. Lesões do ligamento periodontal e do osso alveolar adjacente podem se originar de infecções do periodonto ou da polpa dental.

Segundo Walton & Torabinejad, 1997, a saída de agentes irritantes de polpas necrosadas em direção à região perirradicular tem como consequência uma resposta inflamatória que provoca destruição do ligamento periodontal, reabsorção do osso, cimento e dentina.

Além disso, para se alcançar um prognóstico favorável, a terapia endodôntica e periodontal combinadas são essenciais, uma vez que, isoladamente, não levariam a um prognóstico satisfatório.(Chacker, 1974; Christie & Holthuis, 1990).

A doença periodontal e as alterações pulpares têm sua principal etiologia relacionada a agentes infecciosos. Dessa forma, o alcance de um tratamento endodôntico satisfatório, depende da capacidade do clínico em remover microrganismos e remanescentes teciduais necróticos, ou inibir a atividade metabólica das bactérias do sistema de canais radiculares (Sakamoto et al. 2007).Porém, certos organismos presentes em canais infectados, são considerados resistentes à eliminação.(Gomes et al. 1996), podendo, até mesmo, desenvolver mecanismos que os permitam sobreviver em ambientes inóspitos. (Siqueira Jr. 2001).

2.1. MICROBIOLOGIA ENDODÔNTICA E PERIODONTAL

A microbiota oral normal é composta por mais de 800 espécies bacterianas (Siqueira & Rôças, 2010). Em vista dos determinantes ecológicos, como o baixo potencial de oxidação-redução, pH, temperatura, fatores nutricionais, os sinergismos e antagonismos bacterianos, que fazem do canal radicular um ambiente seletivo para o crescimento bacteriano, somente um número limitado de espécies é comumente isolado de cavidades pulpares de dentes infectados(Gomes et al. 1996). Desse grupo, mais de 90% são microrganismos anaeróbios estritos, com alguns anaeróbios facultativos e raramente aeróbicos. (Baumgartner, 2002, Baumgartner & Hutter, 2001).

Em 1981, Byström e Sundqvist investigaram a presença de bactérias em 15 dentes monorradiculares, com polpas necrosadas e lesões periapicais associadas, durante

momentos distintos do tratamento endodôntico. A instrumentação se mostrou eficaz utilizando apenas soro fisiológico como solução irrigadora. Após o preparo químico mecânico, 47% da amostra ainda apresentava crescimento bacteriano. Microrganismos anaeróbios estritos representavam 88% daqueles encontrados no interior de canais radiculares. As espécies mais comumente isoladas foram *Peptostreptococcus micro* (*Parvimonas micra*), *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum* e *Prevotella intermedia*.

Hashioka *et al.* (1992) estudaram a relação entre a presença de bactérias anaeróbias, em canais radiculares infectados, com sinais e sintomas clínicos. Foram realizadas coletas clínicas em 25 pacientes portadores de periodontite apical, totalizando 28 dentes analisados microbiologicamente. Dor espontânea e dor à percussão mostraram-se associadas à presença frequente de *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides*. Dor à percussão, odor, presença de exudato e aumento de volume mostraram-se relacionadas à presença de *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Bacteroides*. *P. gingivalis* e *P. endodontalis* foram freqüentemente encontrados nos casos com dor à percussão, odor e presença de exsudato.

Gomes *et al.*, em 2008, estudando a microbiota de canais radiculares infectados, investigaram a presença de *Gemella morbillorum* em 50 casos de infecções primárias e em 50 casos de infecções persistentes, através do método cultura-dependente e do Nested-PCR. A técnica de cultura permitiu identificar a espécie em 38% dos canais com infecção primária e em 8% com infecção secundária. Já a metodologia molecular, identificou *Gemella morbillorum* em 82% dos canais com infecção primária e em 72% com infecções secundárias.

De forma semelhante, infecções periodontais são causadas por complexos bacterianos, que ao interagirem com as células do hospedeiro levam a liberação de mediadores inflamatórios, acarretando a destruição das estruturas periodontais. (Holt & Ebersole, 2005). Biofilmes maduros podem ser encontrados em casos de grande profundidade de bolsa e sangramento à sondagem (Holt & Ebersole, 2005), exercendo, pois, função essencial na etiopatogênese das infecções periodontais (Lamont & Jenkinson, 1998).

Segundo Socransky (1998), a microbiota das doenças periodontais pode ser dividida em grupos ou complexos, que representam as associações bacterianas na placa sub-gengival. O primeiro complexo, o complexo vermelho, é composto por *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O segundo complexo, complexo laranja, compreende *Fusobacterium nucleatum* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* (*Parvimonas micra*). *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis* são espécies associadas a esse complexo. As bactérias *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius* formam o terceiro complexo, de cor amarela. O quarto complexo, complexo verde, é constituído por três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a. O quinto complexo, complexo roxo, é formado por *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b, *Selenomonas noxia* e *Actinomyces naeslundii* são espécies associadas aos demais complexos.

Em 1986, Slots *et al.* estudaram a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *B. gingivalis* e *B. intermedius* em sítios que apresentavam doença periodontal. A prevalência de *A. a*, *B. gingivalis* e *B. intermedius* nas lesões em progressão foi elevada. Foi observada menor incidência dessas espécies em sítios onde a doença periodontal estava estagnada. Constatou-se, portanto, que esses patógenos estavam diretamente relacionados com doença periodontal ativa e profundidade de sondagem.

A presença de *Enterococcus faecalis* em biofilme subgengival e na saliva de pacientes portadores de doença periodontal, e em pacientes saudáveis foram avaliadas por Souto & Colombo, em 2007. Dos resultados obtidos pela PCR, *E.faecalis* foi detectado em 34,6% das amostras coletadas de biofilme subgengival e 35% na saliva. A espécie foi mais frequentemente detectada em pacientes portadores de doença periodontal (biofilme subgengival: 48%; saliva: 40.5%) que em pacientes saudáveis (biofilme subgengival: 17%; saliva: 14,6%).

Jaramillo et al. (2005) relataram, ao analisar a microbiota de abscessos periodontais, que as espécies *Fusobacterium* spp, *P. intermedia/nigrescens* e *P.gingivalis* foram frequentemente detectadas. Portanto, a composição microbiológica de abscessos periodontais apresentou similaridade com a microbiota de lesões periodontais crônicas e agressivas.

Kipioti et al (1984), estudando a microbiota periodontal e endodôntica de dentes necrosados, com coroas intactas, sem lesões periapicais e com bolsas periodontais profundas, constatou que a microbiota de canais radiculares era similar àquela encontrada na proximidade das bolsas periodontais. Segundo os autores, a bolsa periodontal era a principal fonte de infecção dos canais radiculares.

Em seu estudo, Kurihara et al. (1995), realizaram coletas clínicas de canais radiculares necrosados e de bolsas periodontais em 5 pacientes. Foi detectado maior número de microrganismos nas bolsas periodontais, com alta prevalência de cocos e bacilos. Bactérias do gênero espiroqueta foram encontradas somente em bolsas periodontais. As espécies mais frequentemente detectadas no interior dos canais radiculares foram *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* (cocos Gram-positivos), *Actinomyces* e *Rothia* (bacilos Gram-positivos). Já em bolsas periodontais, as espécies mais encontradas foram *Campylobacter* spp, *Fusobacterium* spp, *Peptostreptococcus productus* e

Peptostreptococcus spp, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e spp, que são bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios (Gram-negativos e positivos).

Segundo Dahlén, em 2002, as lesões endo-periodontais ainda não possuem uma caracterização microbiológica específica, pois as bactérias associadas a elas são similares às encontradas em lesões endodônticas e periodontais isoladas. O autor propõe que o padrão bacteriano possivelmente seja único, visto que a composição microbiológica das lesões endodônticas e periodontais são semelhantes.

A existência de diversos tipos de comunicações anatômicas entre polpa e tecido periodontal são muito importantes, pelo papel desempenhado na etiopatogenia das lesões endo-periosteais. (Pilatti & Toledo, 2000; Toledo & Rosetti, 2005).

2.2. TREPONEMAS

Treponemas são microrganismos anaeróbios estritos, espiralados, que pertencem ao filo *Spirochaetes* (Paster & Dewhirst, 2006). Nas doenças periodontais, são considerados colonizadores tardios, que habitam bolsas de grande profundidade (Kolenbrander *et al.*, 2002).

Outro aspecto importante desses microrganismos é a presença de flagelos, conferindo-lhes motilidade e quimiotaxia, o que os torna capazes de sobreviverem e progredirem em várias infecções crônicas e agudas na cavidade oral (Dashper *et al.*, 2011). Além disso, a capacidade dos treponemas em se associar com outras espécies aumenta a patogenicidade da infecção. (Fenno & McBride, 1998; Chan & McLaughlin, 2000; Dashper *et al.* 2011).

Essas espécies são exigentes em relação à requisição nutricional e gasosa, dificultando seu cultivo e identificação fenotípica em nível de espécie (Fenno & McBride, 1998).

Por serem de difícil cultivo, devido às suas condições específicas de crescimento e nutricionais (Willis et al. 1999), a melhor forma de identificação de treponemas se dá através de métodos cultura-independentes, baseados na análise do gene 16SrRNA (Dewhirst *et al.*, 2010), uma vez que não é necessário controlar a condição de anaerobiose durante a coleta, não requerem um meio de transporte especial, ou mesmo a realização do cultivo das amostras (Gatti *et al.*, 2000). Métodos moleculares detectam muito menos células do que se analisa pelo método de cultura. Além disso, os métodos moleculares possuem o potencial de demonstrar a eficácia real de um dado protocolo antibacteriano e de esclarecer com precisão o número de células bacterianas que caracterizam o limiar abaixo do qual um resultado satisfatório pode ainda ser alcançado. (Sakamoto *et al.* 2007).

A prevalência de *Treponema socranskii* em infecções endodônticas foi estudada por Siqueira Jr. e Rôças (2003), por meio do *nested PCR*. As amostras foram coletadas de 60 canais radiculares com necrose pulpar e patologias periapicais associadas. *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.

Nóbrega *et al.* (2013) investigaram a presença de *Treponema denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* em 40 dentes com insucesso do tratamento endodôntico e lesão periapical associada, por meio do método de nested-PCR. Em 56,5% das amostras

pelo menos uma espécie estava presente. *T. denticola* e *T. maltophilum* foram as mais prevalentes encontradas em 30% dos casos.

Montagner *et al.* 2010, em seu estudo, detectaram espécies de treponemas em canais radiculares infectados e em exsudato oriundo de abscessos periapicais, em 20 pacientes. O DNA isolado dos canais infectados e dos abscessos periapicais foram, primeiramente, amplificados com o primer universal. Todas as amostras de canais radiculares infectados e abscessos periapicais foram positivas para DNA bacteriano. *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T. medium*, *T. maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. vicentii* foram identificados por meio de uma segunda reação de amplificação (nested-PCR), com espécies específicas 16S. O resultado foi baseado na presença de bandas claras para o específico tamanho molecular, usando 100Kb DNA ladder. As espécies mais frequentemente detectadas foram *T. socranskii* (RC: 17/20; AAA: 15/20), *T. denticola* (RC: 8/20; AAA: 11/20); *T. medium* (RC: 6/20; AAA: 9/20); e *T. amylovorum* (RC: 5/20; AAA: 9/20). Correlação positiva foi encontrada para a presença simultânea de *T. denticola* em canais radiculares infectados e abscessos apicais agudos ($p=0.01$). Associação positiva foi observada entre *T. medium* e *T. vicentii* ($p=0.37$). Nenhuma associação estatística foi observada entre as espécies e sinais e sintomas clínicos.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Investigar a presença de *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* em dentes com necrose pulpar e doença periodontal (caracterizando lesão endoperio combinada) pelo método de Nested-PCR;
- b) Verificar a capacidade do preparo químico-mecânico em reduzir os microrganismos investigados;
- c) Investigar possíveis associações entre as espécies bacterianas detectadas e sinais e sintomas clínicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Para este estudo foram utilizadas coletas clínicas do Banco de Coletas do Laboratório de Microbiologia aplicada a Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (FOP-UNICAMP), armazenadas à temperatura de -80°C. Essas coletas foram realizadas de acordo com Berber (2009) e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP (protocolo nº 034/ 2005 – ANEXO I).

Os critérios de inclusão foram presença de necrose pulpar, lesão periapical e bolsa periodontal com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm em mais de uma face. Pacientes portadores de doenças sistêmicas como, por exemplo, diabetes mellitus e HIV foram excluídos da pesquisa. Aqueles pacientes submetidos a tratamento periodontal no período de um até ano que antecedeu às coletas, ou que fizeram uso de antibiótico sistêmico e/ou local no período de 3 meses antecedentes às coletas também foram excluídos, bem como dentes abertos, com cárie comunicante à câmara pulpar, com trincas, calcificados, com reabsorção externa.

4.2. PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E COLETA DAS AMOSTRAS

Devido à degradação de algumas amostras, apenas as coletas clínicas de 14 pacientes foram utilizadas em nosso estudo. Essas coletas microbiológicas foram realizadas da bolsa periodontal e do interior do canal radicular, antes do preparo químico-mecânico dos canais radiculares e após esse preparo, totalizando 56 coletas analisadas.

Para a coleta das amostras da bolsa periodontal alguns princípios foram observados, como a utilização de técnicas assépticas, remoção de cálculo supragengival, a fim de se obter um fácil acesso para a coleta das amostras, isolamento

relativo, com o intuito de evitar a contaminação por saliva e a atenção para evitar a contaminação química do periodonto.

As coletas das amostras periodontais foram realizadas na bolsa de maior profundidade, com 3 pontas de papel absorventes introduzidas até o fundo da bolsa por 1 minuto e transferidas imediatamente para tubos do tipo eppendorf, contendo 1,0mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Dahlén *et al.*, 1993) e armazenadas à temperatura de -80°C. A coleta clínica das bolsas periodontais foi realizada antes de iniciar o tratamento endodôntico (P1) e após o preparo químico-mecânico (P2) sob fluxo contínuo de nitrogênio.

Alguns princípios foram observados na coleta das amostras dos canais radiculares: utilização de técnicas assépticas, remoção de contaminantes coronários, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, fácil acesso para a coleta das amostras e evitar contaminação química do espaço pulpar.

Para a fase de acesso coronário, a água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com SS estéril e apirogênica. Brocas de alta rotação diamantadas estéreis/ apirogênicas (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C) esféricas 1012HL, 1014HL, 1016HI e tronco cônica de ponta inativa 3082 (K.G. Sorensen Ltda, Barueri, SP, Brasil) foram utilizadas para a remoção de esmalte e dentina.

Quando, clinicamente, observava-se uma fina camada de dentina separando o teto da cavidade pulpar, era realizado o isolamento absoluto do dente envolvido. O isolamento foi realizado com lençol de borracha e, o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loctite, SP) para evitar uma possível infiltração com saliva.

Prosseguiu-se, então, com a anti-sepsia do campo operatório (superfície externa da coroa, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato). Este procedimento foi realizado com swabs estéreis umedecidos, primeiramente, em H₂O₂ a 30% (v/v) e depois em NaOCl 5,25% por 30 segundos cada, sendo subseqüentemente neutralizados com solução estéril de tiosulfato de sódio 5%.

Em uma segunda etapa operatória, na fase de confecção da cavidade de acesso, nova broca estéril foi utilizada. Nesse momento, era realizada a remoção completa do teto da câmara pulpar, sendo a irrigação novamente realizada manualmente com SS estéril. Após a abertura coronária, o campo operatório era submetido novamente a um processo de desinfecção, como descrito anteriormente.

Nos casos de dentes multirradiculares, a amostra foi coletada do canal radicular associado à bolsa periodontal de maior profundidade, de maneira a confinar o exame microbiológico e endotóxico a um único ambiente ecológico.

De forma semelhante à coleta da bolsa periodontal, três cones de papel absorvente estéreis foram introduzidos, um de cada vez, no comprimento total do canal (determinado pela radiografia pré-operatória) permanecendo em posição por 1 minuto e transferidas imediatamente para tubos do tipo eppendorf, contendo 1,0mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Dahlén *et al.*, 1993) e armazenados à temperatura de -80°C. Esse procedimento foi realizado imediatamente após a abertura coronária (E1) e após o preparo químico-mecânico (E2).

Nos casos em que foi constatada a atresia do canal radicular, as coletas foram realizadas por meio de limas de pequeno diâmetro, inseridas até o comprimento total do dente. Seus cabos foram cortados, e as limas depositadas em tubos tipo eppendorf contendo VMGA III e armazenados à temperatura de -80°C.

Uma vez realizadas as coletas iniciais (P1 e E1), a câmara pulpar foi descontaminada com clorexidina gel a 2% (Endogel, Itapetininga, SP). O preparo dos terços cervical e médio do canal radicular foi realizado pelo instrumento rotatório de Níquel-Titânio Hero #20/06 (Micromega, Besançon, França), associado ao uso de brocas de Gates-Glidden #5, #4, #3, #2, em direção coroa-ápice. A odontometria foi feita com o auxílio de um localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel), e limas manuais do tipo K foram utilizadas para a instrumentação do terço apical. À partir da primeira lima que se ajustou no comprimento de trabalho, estabelecido em 1 mm aquém do forame apical, três instrumentos de diâmetros

crescentes estabeleceram o batente apical. Em seguida, outros três instrumentos de diâmetro crescente foram utilizados para um recuo escalonado.

Durante todo o preparo químico-mecânico (PQM), os canais foram inundados com clorexidina gel 2%, anteriormente ao uso de cada lima, e irrigados com soro fisiológico após sua utilização. Ao final do preparo, os canais foram irrigados com 4,0 mL de solução de *tween* 80 + lecitina de soja, para neutralizar a ação da substância química-auxiliar (Siqueira *et al.*, 1999). Uma nova irrigação com 4,0 mL de solução fisiológica foi realizada e 1,0 mL de EDTA foi inserido no interior do canal radicular por 3 minutos, sob agitação com lima tipo K#15. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril.

Como descrito anteriormente, nesse momento, novas coleta microbiológica do canal radicular (E2) e da bolsa periodontal (P2) foram realizadas.

EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DAS COLETAS CLÍNICAS

Como descrito por Nóbrega *et al.* (2013), os tubos contendo VMGA III e os cones de papel absorvente (coletas clínicas) foram descongelados e colocados no agitador de tubos (MA 162-MARCONI, São-Paulo, Brasil) até a completa liquefação do meio de transporte. Após agitação, uma alíquota de 300 µL do VMGA III foi utilizada para a extração do DNA, com o kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, a presença de DNA e sua concentração em cada amostra foram verificadas por meio de um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). As amostras foram então armazenadas a -80 °C até seu uso posterior.

NESTED-PCR

Reação de PCR Universal

Para a realização do Nested-PCR, o gene 16S rRNA foi inicialmente amplificado, por meio de uma reação de PCR, utilizando primers destinados a anelar em regiões externas do gene 16S rRNA (Quadro 1):

QUADRO1: Primers utilizados na reação de PCR universal

Primer	Sequência	Fragmento	Referência
Univ. Foward	5' AG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'	1,505 bp	Willis et al., 1999
Univ. Reverse	5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3'		

O volume de DNA das reações foi ajustado de acordo com sua concentração, para que cada reação fosse realizada com aproximadamente 50ng de DNA. Água MiliQ estéril foi adicionada para complementar o volume de 37 µL, que, somado a 13 µL do mix de reagentes da PCR, resultou em um volume total de reação de 50 µL. Para cada reação, o mix de reagentes foi composto de 5µL de Buffer 10X PCR; 1,5µL de Cloreto de Magnésio; 4µL de dNTP; 1 µL Primer Univ F (25 pMol); 1 µL Primer Univ R (25 pMol); 0,5µL de Platinum Taq DNA Polymerase. Os ciclos de variação de temperatura foram programados em um aparelho termociclador convencional (MJ96G, Biocycler, termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) e obedeceram aos seguintes parâmetros:

Desnaturação inicial: 94°C por 4 min.

30 ciclos:

- ✓ Desnaturação: 94°C por 45 seg.
- ✓ Anelamento: 60°C por 45 seg.
- ✓ Extensão: 72°C por 1,5 min.

Extensão final: 72°C por 15 min.

A mistura de reagentes foi submetida à desnaturação inicial em 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação por 45s à 94°C, anelamento por 45s à 60°C, seguido de uma extensão final em 72°C por 1,5 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (0,9 g de agarose ultrapura Invitrogen + 900 mL de TAE 1x), corado com 0,5µL de brometo de etídio (10mg/ml), por aproximadamente 45 minutos a 90V, e temperatura ambiente em um tampão TAE 1X. Para o controle positivo das reações foi utilizado o DNA extraído de uma cepa bacteriana padrão (ATCC). Ao controle negativo, que teve como objetivo evidenciar qualquer contaminação na mistura de reagentes, não foi acrescentado DNA bacteriano. Produtos de aproximadamente 1500bp visualizados sob luz ultravioleta foram considerados positivos.

Reações espécie- específicas

Verificado o sucesso da reação universal, uma alíquota do produto desta reação foi utilizada como substrato para a realização de outra reação subsequente de PCR, agora utilizando primers espécie-específicos (Tabela 1).

TABELA 1. Primers utilizados na detecção das espécies de *Treponema*.

Alvo	Sequencia (5'-3')	Posição (bp)	Tm (°C)	Ref.
<i>T. amylovorum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8 - 211 (193)	54	(21)
	CTC ACG CCT TTA TTC CGT GAG			
<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGT ATG TGC TCA TTT ACA T	193 - 508 (316)	60	(21)
	TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA			
<i>T. lecithinolyticum</i>	CTT GCT CCT TTC TGA GAG TGG CGG	54 - 1003 (950)	65	(14)
	ACG CAT CCG TAT CTC TAC GAA CTT			
<i>T. maltophilum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8 - 446 (438)	54	(21)
	CCT ATT GTG CTT ATT CAT CAG GC			
	CCT TAT GAA GCA CTG AGT GTA TTC			
<i>T. pectinovorum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8 - 205 (194)	53	(21)
	ATA TAT CTC CAA CTT ATA TGA CCT			
<i>T. socranskii</i>	GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A	179 - 468 (285)	53	(21)
	TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG			
<i>T. vicentii</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8 - 201 (193)	56	(21)
	AAT ACT TCT TAT GAA CAT TGA GAC			
<i>T. medium</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8-200 (192)	54	(21)
	CCT TAT GAA GCA CTG AGT GTA TTC			

O volume total das reações de PCR espécie-específica foi de 25 μL , sendo 1,5 μL de produto da reação universal, 18,7 μL de água MiliQ estéril e 4,8 do mix de reagentes, composto por 2,5 μL de Buffer 10X PCR; 1,25 μL de Cloreto de Magnésio; 0,5 μL de dNTP; 0,25 μL do Primer F (25 pMol); 0,25 μL do Primer R (25 pMol); 0,125 μL de Platinum Taq DNA Polymerase. Para os controles positivos foram utilizados os produtos da PCR universal de amostras positivas de estudos anteriores.

O volume total de cada produto da segunda reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose à 1%, corado por brometo de etídio. A detecção da espécie foi considerada positiva na presença da banda no tamanho previsto (Tabela 1). Para confirmar a ausência de DNA bacteriano, em todas as amostras negativas, esse segundo grupo de reações foi repetido com o dobro do volume inicial de produto da PCR universal.

5. RESULTADOS

Todas as 56 amostras analisadas no presente estudo apresentaram DNA bacteriano, detectado pela reação universal de amplificação do gene 16S rRNA (Figura 1 e Tabela 2).

Das coletas realizadas anteriormente ao preparo químico-mecânico (Tabelas 3 e 4), foi encontrado DNA de *Treponema* spp. em 13 das 14 amostras das bolsas periodontais e em 13 das 14 amostras dos canais radiculares, portanto, treponemas não foram encontrados em somente 1 caso. O número de espécies por caso positivo variou de 2 a 7 (média \approx 4,4). A espécie mais prevalente foi *T. denticola* seguida de *T. maltophilum*, *T. medium* e *T. socranskii*. As espécies *T. lecithinolyticum*, *T. amylovorum*, *T. pectinovorum* e *T. vicentii* foram encontradas em menor frequência. *T. vicentii* não foi encontrado em amostras provenientes do canal radicular. Nos canais radiculares, as espécies detectadas com maior frequência foram *T. denticola* (10/14) e *T. maltophilum* (10/14), seguidas de *T. socranskii* (7/14), *T. medium* (6/14), *T. amylovorum* (3/14). As espécies *T. pectinovorum* e *T. lecithinolyticum* foram encontradas em somente uma amostra cada uma. Nas bolsas periodontais, a espécie mais frequentemente detectada foi *T. denticola* (13/14), seguida de *T. maltophilum* (12/14), *T. socranskii* (8/14), *T. medium* (7/14), *T. lecithinolyticum* (6/14), *T. amylovorum* (5/14). As espécies *T. vicentii* e *T. pectinovorum* foram encontradas com menor frequência.

Após o preparo químico-mecânico (Tabelas 5 e 6), o DNA de *Treponema* spp. foi encontrado em 12 das 14 amostras dos canais radiculares e em 13 das 14 amostras das bolsas periodontais. O número de espécies por caso positivo variou de 1 a 3 nos canais radiculares (média = 1,8) e de 1 a 5 nas bolsas periodontias (média = 3,2).

Nos canais radiculares, a espécie mais frequentemente identificada, pós procedimento endodôntico, foi *T. denticola* (8/14), seguida de *T. socranskii* (5/14) e *T. amylovorum* (5/14). As espécies *T. medium* (3/14) e *T. maltophilum* (2/14) foram observadas com menor frequência.

Nas bolsas periodontais, a espécie mais frequentemente encontrada, após o preparo químico-mecânico, foi *T. denticola* (13/14), seguida de *T. maltophilum* (10/14) e *T. socranskii* (9/14). As espécies *T. medium* (5/14) e *T. amylovorum* (4/14) foram observadas com menor frequência.

Não foi detectado o DNA de *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* em nenhuma das amostras finais, tanto aquelas provenientes de bolsas periodontais, quanto as de canais radiculares. *T. pectinovorum* foi detectado em somente uma amostra, proveniente da bolsa periodontal.

T. denticola, *T. maltophilum*, *T. socransky* e *T. medium* foram as espécies mais frequentemente detectadas no interior de canais radiculares e bolsas periodontais em ambos os momentos da pesquisa (Figura 3).

TABELA 2. Resultados obtidos com a amplificação do DNA bacteriano (gene 16S rRNA).

<i>Antes PQM</i>	<i>Reação universal</i>	<i>Após PQM</i>	<i>Reação Universal</i>
1EA	+	1ED	+
1PA	+	1PD	+
2EA	+	2ED	+
2PA	+	2PD	+
3EA	+	3ED	+
3PA	+	3PD	+
4EA	+	4ED	+
4PA	+	4PD	+
5EA	+	5ED	+
5PA	+	5PD	+
6EA	+	6ED	+
6PA	+	6PD	+
7EA	+	7ED	+
7PA	+	7PD	+
8EA	+	8ED	+
8PA	+	8PD	+
9EA	+	9ED	+
9PA	+	9PD	+
10EA	+	10ED	+
10PA	+	10PD	+

11EA	+	11ED	+
11PA	+	11PD	+
12EA	+	12ED	+
12PA	+	12PD	+
13EA	+	13ED	+
13PA	+	13PD	+
14EA	+	14ED	+
14PA	+	14PD	+

(Número) corresponde ao paciente; **(E)** coleta no canal radicular; **(P)** coleta na bolsa peiodontal; **(A)** indica que a coleta foi realizada antes do preparo químico-mecânico; **(D)** indica que as coletas foram realizadas após o preparo químico-mecânico.

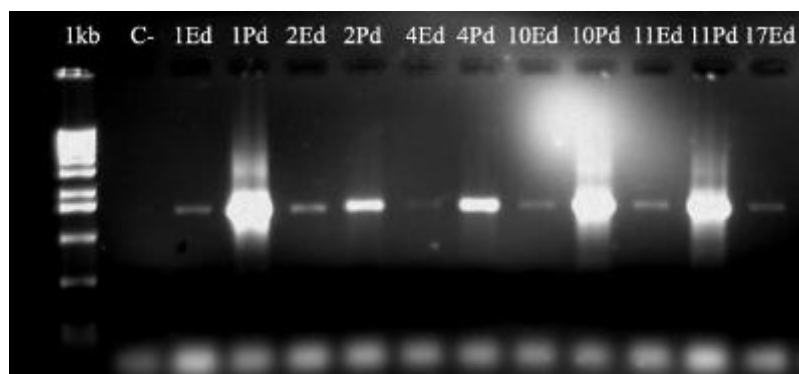


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da amplificação do DNA bacteriano (PCR universal) para as amostras testadas. (Ld) Peso molecular padrão de 1Kb; (C-) Controle negativo da reação;

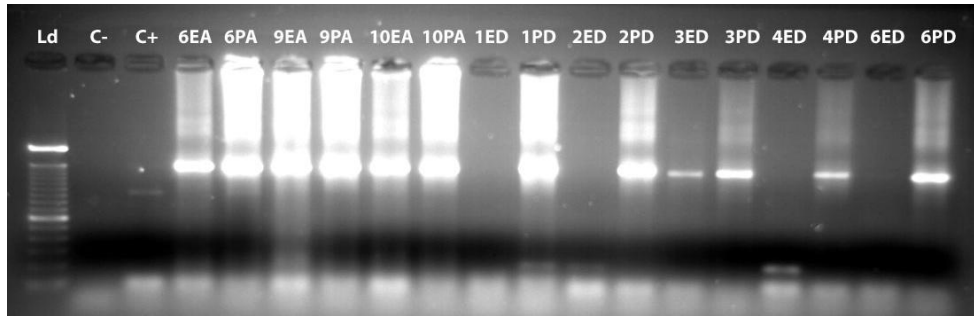


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da reação com os primers específicos para *T. lecithinolyticum* para algumas das amostras testadas. (Ld) Peso molecular padrão de 1Kb; (C-) Controle negativo da reação; (C+) controle positivo

Detecção de Treponema spp antes do preparo químico-mecânico

Tabela 3. Detecção de Treponema spp. nos canais radiculares antes do preparo químico-mecânico

	Canal Radicular							
	<i>T. denticola</i>	<i>T. amylovorum</i>	<i>T. maltophilum</i>	<i>T. Medium</i>	<i>T. socranskii</i>	<i>T. pectinovorum</i>	<i>T. vicentii</i>	<i>T. lecithinolyticum</i>
1EA	+	-	+	+	+	-	-	-
2EA	+	-	+	+	+	-	-	-
3EA	+	-	+	+	+	-	-	+
4EA	+	-	-	-	-	-	-	-
5EA	-	+	+	-	-	-	-	-
6EA	+	+	-	-	+	-	-	-
7EA	+	-	+	-	-	-	-	-
8EA	+	-	+	-	-	-	-	-
9EA	-	-	+	-	-	-	-	-
10EA	+	-	+	+	+	-	-	-
11EA	-	-	-	+	+	-	-	-
12EA	+	+	+	+	+	-	-	-
13EA	+	-	+	-	-	+	-	-
14EA	-	-	-	-	-	-	-	-

(Número) corresponde ao paciente; (P) coleta na bolsa periodontal; (A) indica que a coleta foi realizada antes do preparo químico-mecânico

Tabela 4. Detecção de Treponema spp. nas bolsas periodontais antes do preparo químico-mecânico

Bolsa Periodontal								
	<i>T. denticola</i>	<i>T. amylovorum</i>	<i>T. maltophilum</i>	<i>T. Medium</i>	<i>T. socranskii</i>	<i>T. pectinovorum</i>	<i>T. vicentii</i>	<i>T. lecithinolyticum</i>
1PA	+	+	+	+	+	-	+	+
2PA	+	+	+	+	+	-	-	+
3PA	+	+	+	+	+	+	-	+
4PA	+	-	+	-	-	-	-	-
5PA	+	-	+	-	-	-	-	-
6PA	+	-	+	-	+	-	-	-
7PA	+	-	+	-	+	-	-	-
8PA	+	-	+	-	-	-	-	+
9PA	+	-	+	+	+	+	+	-
10PA	+	-	+	+	+	-	-	+
11PA	+	+	+	-	-	+	-	+
12PA	+	-	-	+	-	-	-	-
13PA	+	+	+	+	+	-	-	-
14PA	-	-	-	-	-	-	-	-

(Número) corresponde ao paciente; (P) coleta na bolsa periodontal; (A) indica que a coleta foi realizada antes do preparo químico-mecânico

Detecção de *Treponema* spp após o preparo químico-mecânico

Tabela 5. Detecção de *Treponema* spp. nos canais radiculares após o preparo químico-mecânico

Amostras	<i>T.</i> <i>lecithinolyticum</i>	<i>T.</i> <i>denticola</i>	<i>T.</i> <i>socranskii</i>	<i>T.</i> <i>maltophilum</i>	<i>T.</i> <i>amylovorum</i>	<i>T.</i> <i>medium</i>	<i>T.</i> <i>pectinovorum</i>	<i>T.</i> <i>vicentii</i>
1ED	-	+	+	-	-	+	-	-
2ED	-	-	-	-	+	-	-	-
3ED	-	-	+	-	-	-	-	-
4ED	-	+	-	-	+	-	-	-
5ED	-	-	+	-	-	-	-	-
6ED	-	-	-	-	+	-	-	-
7ED	-	-	-	-	-	-	-	-
8ED	-	+	-	-	-	-	-	-
9ED	-	+	+	+	-	-	-	-
10ED	-	+	+	-	-	+	-	-
11ED	-	-	-	-	+	+	-	-
12ED	-	+	-	+	+	-	-	-
13ED	-	+	-	-	-	-	-	-
14ED	-	+	-	-	-	-	-	-

(Número) corresponde ao paciente; (E) coleta no canal radicular; (D) indica que as coletas foram realizadas após o preparo químico-mecânico.

Tabela 6. Detecção de *Treponema* spp. nos canais radiculares após o preparo químico-mecânico

Amostras	<i>T.</i> <i>.lecithinolyticum</i>	<i>T.</i> <i>denticola</i>	<i>T.</i> <i>socranskii</i>	<i>T.</i> <i>maltophilum</i>	<i>T.</i> <i>amylovorum</i>	<i>T.</i> <i>medium</i>	<i>T.</i> <i>pectinovorum</i>	<i>T.</i> <i>vicentii</i>
1PD	-	+	+	+	+	+	-	-
2PD	-	+	-	-	-	-	-	-
3PD	-	+	+	+	+	+	-	-
4PD	-	+	+	+	-	-	-	-
5PD	-	+	+	+	+	-	-	-
6PD	-	+	+	+	+	-	-	-
7PD	-	+	+	+	-	-	-	-
8PD	-	+	+	-	-	-	-	-
9PD	-	+	-	-	-	-	-	-
10PD	-	-	-	+	-	+	-	-
11PD	-	+	+	+	-	-	+	-
12PD	-	+	+	+	-	+	-	-
13PD	-	+	-	+	-	+	-	-
14PD	-	+	-	-	-	-	-	-

(Número) corresponde ao paciente; (P) coleta na bolsa periodontal; (D) indica que as coletas foram realizadas após o preparo químico-mecânico.

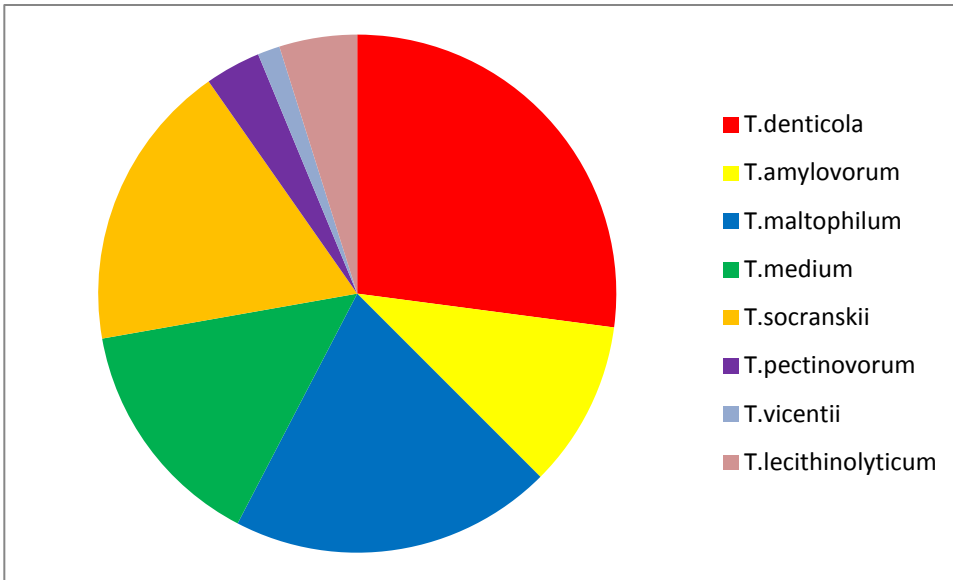


Figura 3. Espécies de treponemas detectadas no interior de canais radiculares e bolsas periodontais em ambos os momentos da pesquisa.

6. DISCUSSÃO

Um grande número de patógenos encontrados em lesões periodontais também é detectado em infecções endodônticas, embora haja na literatura poucos estudos relacionando ambas as doenças em um único dente, ou seja, com lesão endo-periodontal.

Alguns autores encontraram correlação entre a doença periodontal e mudanças inflamatórias e degenerativas da polpa (Seltzer *et al.*, 1963, Stallard, 1972, Rubach, 1965), outros, por outro lado, não observaram tal comportamento (Czarnecki & Schilder, 1979, Mazur & Massler, 1964). Nesse sentido, Langeland *et al.* (1974) concluíram que a polpa somente degenera quando a lesão periodontal atinge o forame apical; e caso o forame não seja alcançado pela doença, apenas pequenas mudanças e/ou danos ocorrem a ela.

As microbiotas periodontais e endodônticas são complexas no que se refere a sua composição (Berber, 2009), e os fatores de virulência, que influenciam na natureza da colonização das espécies, tais como adesão, coagregação, e interações antagonistas e sinérgicas têm sido estudados *in vitro* por muitos anos.

Espécies do gênero *Treponema* spp. são microrganismos anaeróbios estritos, espiralados, que possuem fatores de virulência, permitindo-lhes interagir com outros patógenos e com as células do hospedeiro na promoção ou progressão da doença (Dashper *et al.*, 2011). Seus principais fatores de virulência são a motilidade e a baixa imunogenicidade, que os tornam capazes de colonizar novos sítios e a penetrar no interior do tecido (Dashper *et al.*, 2011). Além disso, treponemas são colonizadores tardios de alta prevalência em biofilmes subgingivais de periodontites crônicas, porém pouco encontrados em infecções crônicas de canais radiculares.

A complexa necessidade nutricional e gasosa dessas bactérias dificulta o desenvolvimento de estudos *in vitro*, e fez dos métodos moleculares, como o Nested-PCR (nPCR), uma ferramenta de escolha na detecção das espécies desse gênero em infecções endodônticas e periodontais. Além disso, métodos moleculares são usados

para detectar espécies bacterianas oriundas de canais radiculares de dentes com lesão periapical associada (Gomes *et al.* 2008). O nested-PCR é uma potente variação da técnica de PCR, que apresenta um limite de detecção mais acentuado. Enquanto o PCR convencional consegue detectar até 10^3 células, com o nested-PCR é possível detectar até 10 células (Spratt, 2004). O nested-PCR, utilizado neste estudo, foi previamente descrito por Willis *et al.* (1999) e aplicado em diversos trabalhos (Willis *et al.*, 1999; Siqueira & Rocas, 2003; Siqueira & Rocas 2004; Montagner *et al.*, 2010; Nobrega *et al.*, 2011) na detecção de *Treponema* spp. diretamente de amostras clínicas. *Treponema* spp., espécies associadas com a doença periodontal, passaram a ser detectadas com maior frequência em infecções endodônticas (Jung *et al.*, 2001; Siqueira-Junior *et al.*, 2001; Baumgartner *et al.*, 2003; Siqueira-Junior & Roças, 2004b; Foschi, *et al.*, 2005; Roças & Siqueira-Junior, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Montagner *et al.*, 2010). Dessa forma, os métodos culturas-independentes têm demonstrado que a microbiota de infecções endodônticas pode ser cada vez mais complexa, havendo envolvimento de espécies fortemente associadas à severidade e progressão da doença periodontal, como às do gênero *Treponema*. (Siqueira & Rocas, 2004; Montagner *et al.*, 2010; Nóbrega *et al.*, 2013).

O nested-PCR, entretanto, apresenta algumas desvantagens. Por ser um método altamente sensível, se torna mais susceptível a contaminação entre o primeiro e segundo conjunto de reações (Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006a; Montagner *et al.*, 2010). No presente trabalho, todas as reações tiveram um controle negativo, a fim de evitar a possível ocorrência de resultados falso-positivos. Todos os controles negativos asseguraram a ausência de contaminação e fidelidade dos resultados positivos.

A especificidade dos primers utilizados neste estudo foi determinada anteriormente (Willis *et al.*, 1999; Siqueira & Rocas, 2003). Foram observadas hibridizações cruzadas, fato que pode ser explicado pela presença dos primers da primeira reação, que continuaram a anelar durante o segundo conjunto de reações. Nesses casos, assim como no estudo de Siqueira & Rocas (2004), não foram observadas bandas do tamanho previsto.

No presente trabalho, o DNA bacteriano foi detectado inicialmente, através da reação universal em todas as amostras analisadas. Uma alta prevalência do DNA de espécies do gênero *Treponema* foi observada (92,86%) tanto na bolsa periodontal, quanto no interior do canal radicular de dentes com lesão endo-perio associadas. A espécie mais prevalente foi *T. denticola*, que sendo um patógeno periodontal putative é associado à *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, formando o “complexo vermelho”, descrito por Socransky *et al.* (1998) como um grupo bacteriano relacionado aos parâmetros clínicos de periodontites.

Diversos estudos na literatura identificaram, anteriormente, várias espécies do gênero *Treponema* em infecções endodônticas primárias, sintomáticas e com abscessos, ou casos assintomáticos com lesão periapical associada (Siqueira-Junior *et al.*, 2001; Baumgartner *et al.*, 2003; Siqueira-Junior & Roças, 2003; 2004b; Roças & Siqueira, 2005; Sakamoto *et al.*, 2009; Montagner *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum trabalho, até o momento, havia investigado a presença de *T.denticola*, *T.amylovorum*, *T.maltophilum*, *T.medium*, *T.socranskii*, *T.pectinovorum*, *T.vicentii*, *T.lecithinolyticum* em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com lesão endo-periodontal, e a suscetibilidade dessas espécies ao preparo químico mecânico.

O número de espécies bacterianas encontradas nas bolsas periodontais foi maior do que o encontrado nos canais radiculares envolvidos, em ambos os momentos da pesquisa. Inicialmente, a média de espécies encontradas nas bolsas periodontais foi de 7, nos canais radiculares foi de 5,4. Estes resultados estão de acordo com Kipioti *et al.* (1984), Kerekes *et al.* (1990) e Kurihara *et al.* (1995). Depois de realizado o procedimento biomecânico, nas bolsas periodontais a média de espécies detectadas permaneceu 7 e em canais radiculares foi de 4,6.

Dessa forma, com o preparo químico-mecânico, pôde-se observar a redução significativa do número de espécies encontradas nos canais radiculares, porém essa redução não se mostrou significativa na bolsa periodontal. Embora em ambos os locais tenha sido observada a redução no número de espécies, a frequência em que o DNA de *Treponema* spp. foi encontrada permaneceu praticamente inalterada.

A maioria dos trabalhos aponta uma maior ocorrência de *Treponema* spp. em infecções agudas, indicando sua elevada patogenicidade, e a possibilidade de associação de determinadas espécies com sinais e sintomas clínicos (Baumgartner *et al.*, 2003; Siqueira-Junior & Roças, 2004b; Foschi *et al.*, 2006; Gomes, *et al.*, 2006a). No presente estudo, nenhuma correlação positiva foi encontrada para a presença simultânea das espécies no canal radicular e bolsa periodontal. Associações positivas foram observadas entre *T. socranskii* e *T. medium* ($p=0,003$). A sensibilidade à palpação mostrou-se associada à presença de *T. medium* nos canais radiculares e a *T. amylovorum* na bolsa periodontal ($p=0,031$). *T. medium*, nos canais radiculares, estava também associado à sensibilidade a percussão ($p=0,023$).

Nóbrega *et al.*, em 2013, investigaram a presença de *Treponema* spp. em casos de insucesso do tratamento endodôntico. As espécies mais frequentemente detectadas foram *T.denticola*, *T.maltophilum*, *T.socranskii* e *T.medium*. Essas mesmas espécies foram também encontradas com maior frequência em bolsas periodontais e canais radiculares de dentes portadores de lesão endo-perio, anteriormente ao preparo químico mecânico.

Certamente novos microrganismos ainda serão identificados, porém fica o desafio, em meio à detecção de tantas espécies, de saber qual a importância e as implicações clínicas destes achados laboratoriais (Gomes & Montagner, 2010).

No que se refere ao estudo da microbiota de dentes com lesão endo-perio, a literatura é limitada e escassa. Nesse sentido, a melhor caracterização das interações bacterianas e do perfil das comunidades microbianas, relacionadas às infecções endodônticas e periodontais, em suas diversas modalidades (infecções primárias sintomáticas e assintomáticas, infecções secundárias, persistentes e endo-periodontais) (Jung *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2008; Gomes & Montagner, 2010) se faz necessária para a compreensão do progresso da doença.

7. CONCLUSÃO

Considerando os resultados do presente estudo e suas limitações, foi possível concluir que:

- a) A alta prevalência de *Treponema* spp. encontrada em canais radiculares e bolsas periodontais, indica que espécies desse gênero são importantes patógenos na comunidade microbiana de dentes com lesão endo-periodontais.
- b) O preparo químico-mecânico reduziu significativamente o número de espécies (DNA) de *Treponema* nos canais radiculares, porém o mesmo não ocorreu na bolsa periodontal.
- c) Espécies como *T. medium* e *T. amylovorum* estavam associadas à sensibilidade a palpação. *T. medium* também apresentou associação com a sensibilidade à percussão.
- d) Foi observada uma associação positiva entre as espécies *T. medium* e *T. socranskii*.

REFERÊNCIAS

Baumgartner JC, Hutter JW. Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Burns RC, editors. Pathways of the pulp. 8th ed: Mosby; 2001. p. 501- 518.

Baumgartner JC. Endodontic microbiology. In: Walton RE, Torabinejad M, editors. Principles and practice of endodontics. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Co.; 2002. p. 282-293.

Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. J Endod 2003;29(12):794-7.

Berber VB. Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao PQM e a medicações intracanaís entre sessões de atendimento. 2009. 250p. Tese (Doutorado em clínica odontológica-Piracicaba)-Universidade Estadual de Campinas.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand. J. Dent. Res. 1981; 89: 321-8.

Chan EC, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. Oral Microbiol Immunol 2000;15(1):1-9.

Chacker FM. The endodontic-periodontic continuum. *Dent Clin N Amer.* 1974; 18(2): 383-414.

Chilton NW. Periodontic-endodontic relationships: a synthesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;34(2):327-8.

Christie WH, Holthuis AF. The Endo-Perio Problem in Dental Practice: Diagnosis and Prognosis. *J Can Dent Assoc.* 1990; 56 (11):1 005-11.

Czarnecki R, Schilder AA. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. *J Endod.* 1979; 5:242-53.

Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:375-82.

Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontology 2000.* 2002; 28(1): 206-39.

Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res* 2011;90(6):691-703.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, *et al.* The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192(19):5002-17.

Fenno JC, McBride BC. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe*. 1998;4(1):1-17.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as endodontic irrigant. *J Endod*. 2001; 27:452-455.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Patri C. Detection of bacteria in endodontic sample by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20: 289-95.

Foschi F, Izard J, Sasaki H, Sambri V, Prati C, Muller R *et al*. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *J Dent Res*. 2006; 85(5): 761-5.

Garrote P. Endodontics: Part 9 Calcium hydroxide, root resorption, endo-perio lesions. *British Dental Journal*. 2004; 197: 735-7 43.

Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000;16(5):197-204.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*. 1996; 29(4): 235-41.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod* 2006;32(10):937-40.

Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failure endodontic treatment. *J Endod.* 2006a; 32(10): 937-940.

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, Souza- Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:519-25.

Gomes BPF, Montagner F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. . In: Ferrari, PDPHP, Bombana PDAC, editors. *A Infecção Endodôntica e sua Resolução.* 1 ed. São Paulo: Livraria Santos; 2010. p. 22-45.

Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod.* 1992;18:558-61.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005; 38:72-122.

Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Batancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J Clin Period.* 2005; 32: 1213-1218.

Jung IY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ *et al.* Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 329-34.

Kerekes K, Olsen I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:1-5. Review.

Kipioti A, Nakou M, Legakis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984; 58: 213-20.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev: MMBR.* 2002;66(3):486-505.

Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco AI, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J End.* 1995; 21:617-621.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:1244-63.

Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria and pulpal histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Path*. 1974; 37: 257-70.

Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Path*. 1964; 17: 592-603.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998; 31: 1-7.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod* 2010;36(11):1796-9.

Nóbrega LM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. *Treponema* diversity in root canals with endodontic failure. *Eur J Dent*. 2013 Jan;7(1):61-8.

Paster BJ, Dewhirst FE. The phylogenetic diversity of the genus *Treponema*. In: Radolf, JD, Lukehart SA, editors. *Pathogenic Treponema: molecular and cellular biology*. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2006. p. 9-18.

Pilatti GL, Toledo BEC. As comunicações anatômicas entre polpa e periodonto e suas consequências na etiopatogenia das lesões endoperiodontais. *Rev Paul Odontol.* 2000; 22(5): 38-40.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36: 1-11.

Rocas IN, F. SJ, Santos KRN, Coelho AMA. Red complex (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:468-471.

Roças IN, Siqueira-Junior JF. Occurrence of two newly named oral Treponemes – *Treponema parvum* and *Treponema putidum* – in primary endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 372-375.

Rubach WC, Mitchell DF. Periodontal disease, accessory canals and pulppathosis. *J Periodontol.* 1965; 36: 34–8.

Sakamoto M, Siqueira-Junior JF, Roças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 19-23.

Sakamoto M, Siqueira-Junior JF, Roças IN, Benno, Y. Diversity of spirochetes in endodontic infection. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(5): 1352-7.

Santiago CN, Fonseca GA. Influência da Doença Periodontal na Polpa Dental. *Rev Bras Odonto/.* 1983; 40(3): 19-9.

Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The interrelationship of pulp and periodontal disease. *Oral Surg.* 1963; 16: 1474-90.

Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J.Endod.* 1997; 3: 167-9.

Siqueira Jr JF, Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999; 25: 332-5.

Siqueira Jr JF, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 89: 7448.

Siqueira-Junior JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16s rDNA – directed polymerase chain reaction. *J Endod.* 2001; 28(3): 164-7.

Siqueira-Junior JF, Roças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium* e *t. lecithinolyticum* in primary root canal infections. Arch Oral Biol. 2003; 48: 495-502.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. Oral Microbiol Immunol 2004;19(5):336-9.

Siqueira-Junior JF, Roças IN. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. Oral Microbiol Immunol. 2004b; 19: 336-9.

Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol. 1986; 13: 570-577.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25:134-144.

Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. The endodontic-periodontal lesion: a rational approach to treatment. *J Am Dent Assoc.* 1995; 126: 473- 479. 50.

Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. Arch Oral Biol. 2008;53(2):155-60.

Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Topics*. 2004; 9(1): 5-14.

Stallard RE. Periodontic-endodontic relationships. *Oral Surg*. 1972; 34: 314-26.

Toledo BEC, Rosetti EP. Lesões endo-periodontais combinadas. *In: Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos* . . ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

Umemoto T, Nakazawa F, Hoshino E, Okada K, Fukunaga M, Namikawa I. *Treponema medium* sp. Nov., isolated from human subgingival dental plaque. *Int J Syst bacterial*. 1997; 47(1): 67-72.

Walton RE, Torabinejad M. *Princípios e Prática em Endodontia*. 1. ed. São Paulo: Santos; 1997.

Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter LA, Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven *Treponema* species in health and disease-associated dental plaque by Nested-PCR. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(3): 867-9.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Syst bacterial*. 1996; 46(3): 745-52.

ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

ANEXOS

ANEXO I - Comitê de ética-certificado



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Ação antimicrobiana in vivo de medicações intracanalais sobre patógenos endo-periodontais encontrados em canais radiculares e bolsas periodontais", protocolo nº 034/2005, dos pesquisadores **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** e **VANESSA BELLOCCHIO BERBER**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 01/06/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Antimicrobial action of intracanal medication on periodontal-endodontic pathogens found in root canals and periodontal pockets", register number 034/2005, of **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** and **VANESSA BELLOCCHIO BERBER**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 01/06/2005.

Cynthia Pereira Machado Tabchoury
Cynthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Jacks Jorge Júnior
Jacks Jorge Júnior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Notas: O título do trabalho aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notes: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2 – Cópia do parecer de aprovação do Relatório Parcial de Iniciação Científica.

PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – QUOTA INSTITUCIONAL UNICAMP

(quota de agosto de 2012 a julho de 2013)

PARECER SOBRE RELATÓRIO PARCIAL DE ATIVIDADES

Bolsista: RAFAELA CASADEI CHAPOLA – RA 105584

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Projeto: Investigação de Treponemas spp. nos canais radiculares e bolsas periodontais antes e durante o preparo químico-mecânico de dentes com envolvimento endo-periodontal

PARECER

Relatório retrata adequadamente a execução da pesquisa até o momento, descrevendo todas as etapas cumpridas. Em que pese o CR da aluna ter ficado ligeiramente abaixo em relação àquele no período do pedido da bolsa, a aluna está cumprindo com êxito sua pesquisa.

Conclusão do Parecer:

APROVAR (SIM)
REFORMULAR (NÃO)
REJEITAR (NÃO)

Pró-Reitoria de Pesquisa, 24 de setembro de 2013.



Mirian Cristina Marçanola
PRP / PIBIC - Unicamp
Matr. 299062

