

LETÍCIA MARIA MENEZES NÓBREGA

**Investigação da presença de *Treponema* spp.,
através de Nested-PCR, em casos de insucesso do
tratamento endodôntico.**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do Título de Especialista em Endodontia.

PIRACICABA

2011

LETÍCIA MARIA MENEZES NÓBREGA

Investigação da presença de *Treponema* spp., através de
Nested-PCR, em casos de insucesso do
tratamento endodôntico.

Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, como requisito para
obtenção do Título de Especialista em
Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Gomes

PIRACICABA

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

N669i	Nóbrega, Letícia Maria Menezes. Investigação da presença de Treponema spp. em casos de insucesso do tratamento endodôntico através de nested-PCR / Letícia Maria Menezes Nóbrega. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011. 48f. : il. Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes. Monografia (Especialização) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Endodontia. 2. Microbiologia. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (eras/fop)
-------	---

*Dedico este trabalho aos meus pais José e Maria de Lourdes,
meus irmãos Larissa e Túlio, meu noivo Rodrigo e meus
sobrinhos Daniel e José Henrique, presentes que Deus me
deu durante o curso. Amo vocês!*

Agradecimentos...

À Deus e Nossa Senhora pela proteção e luz que ilumina meu caminho.

À minha família pelo amor, apoio e incentivo que sempre me deram.

Ao meu noivo Rodrigo pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

Às amigas Luana e Brunna pela amizade, convivência e companhia durante esta etapa.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, minha orientadora, pela atenção, apoio, confiança, ensinamentos e oportunidades que me deu.

Aos demais professores de Endodontia da FOP-UNICAMP, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof. Adriana de Jesus Soares, pela atenção e ensinamentos dedicados.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior.

Aos queridos professores Cícero Romão Gadê Neto e Rejane Andrade de Carvalho, que despertaram meu interesse pela Endodontia, muito me ensinaram e sempre me incentivaram.

Aos colegas de turma Andrea Milanez, Arianne Marinho, Camila Marrara, Cláudia Suzuki, Erika Clavijo, Fernanda Bezerra, Marcela, Paula Mendonça, Tatiana Salvador, Thais Mageste, Thiago Farias e a todos os colegas de pós-graduação pelo aprendizado e alegre convivência.

Às funcionárias Ana Cristina Godoy, Wanderly Almeida, Daiane Scutton e Geovania Almeida pela amizade e auxílio.

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3. PROPOSIÇÃO.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO.....	48

RESUMO

Os microrganismos que resistem ao preparo químico-mecânico (infecção persistente), ou contaminam o canal radicular após o tratamento através das infiltrações coronárias (infecção secundária) são os principais responsáveis pelos insucessos endodônticos. Nesses casos há predominância de bactérias facultativas e gram-positivas, entretanto espécies fastidiosas, gram-negativas e estritas (*Treponema* spp.) vêm sendo detectada através de metodologias moleculares. É importante conhecer bem o perfil microbiano dos retratamentos para tratá-los melhor, pois a estratégia para se combater uma infecção deve ser baseada no conhecimento da microbiota. O objetivo deste trabalho foi investigar 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, através de nested-PCR. As amostras foram coletadas utilizando cones de papel absorvente estéreis e o DNA foi extraído para realização de nested-PCR, utilizando primers universal e específicos. Em 56,5% das amostras pelo menos uma espécie foi detectada. *T. denticola* e *T. maltophilum* foram as mais prevalentes (30%). Associação positiva ($p<0,05$) foi observada entre *T. denticola* e *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*; entre *T. medium* e *T. socranskii*, *T. maltophilum*; entre *T. maltophilum* e *T. socranskii*, *T. lecithinolyticum*. Foi encontrada correlação entre *T. lecithinolyticum* e presença de retentor intra-radicular ($p<0,05$). Concluiu-se que a ocorrência de diferentes espécies do gênero *Treponema* pode indicar uma maior complexidade da microbiota dos insucessos endodônticos.

Palavras-Chave: insucesso endodôntico, microbiologia, nested-PCR

ABSTRACT

Microorganisms that resist to chemo-mechanical preparation (persistent infection) or infect the root canal after the treatment through coronary leakages (secondary infection) are the major causative agents of endodontic therapy failure. This microbiota is characterized by the predominance of facultative bacteria and gram-positive, however fastidious, gram-negative and strict species (*Treponema* spp.) have been one of the main focus in microbial molecular biology. The knowledge of root canal microbiota is important for the establishment of the correct root canal therapy. The aim of this study was to detect *Treponema denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* in 40 teeth with endodontic failure and periapical lesions, by nested-PCR. Samples were collected with paper points, the DNA was extract and amplification reactions were performed by using universal and specifics primers. At least 1 species was detect in 56.5% of the samples analyzes. *T. denticola* and *T. maltophilum* were the most frequent (30%). Positive association ($p<0.05$) was verified between *T. denticola* and *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*; between *T. medium* and *T. socranskii*, *T. maltophilum*; between *T. maltophilum* and *T. socranskii*, *T. lecithinolyticum*. Correlation between *T. lecithinolyticum* and teeth presenting intraradicular post was verified ($p<0,05$). It was concluded that the detection of *Treponema* spp. in persistent/secondary infection possibly indicates that the microbiota of endodontic failure seems to be even more complex than previously showed in endodontic literature.

Key-Words: endodontic failure, microbiology, nested-PCR

1. INTRODUÇÃO

O insucesso do tratamento endodôntico está associado à persistência da infecção ou reinfecção do canal radicular (infecção secundária). A presença das bactérias e seus produtos metabólicos causam uma resposta inflamatória periapical que induz essa perda óssea e formação de lesão periapical. Quando há persistência de sintomatologia ou observa-se radiograficamente a presença de rarefações ósseas periapicais que permaneceram inalteradas, aumentaram ou surgiram após o tratamento endodôntico estamos diante de um quadro clínico indicado ao retratamento endodôntico. (Ricucci *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2010a).

Alguns fatores podem influenciar negativamente no prognóstico e estão relacionados com falhas do tratamento endodôntico como, por exemplo, problemas técnicos durante a realização do tratamento, infecção intra-radicular persistente ou secundária, infecção extra-radicular, tamanho da lesão, reação de corpo estranho e presença de cistos verdadeiros (Sundqvist *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1999a,b; Siqueira-Junior, 2001; Peiciliene *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2004).

Tanto os microrganismos que resistem ao preparo químico-mecânico e/ou medicação intracanal (infecção persistente), quanto os que contaminam o canal após o tratamento endodôntico através das infiltrações coronárias (infecção secundária), são apontados na literatura como os principais responsáveis pelos insucessos endodônticos (Sundqvist *et al.*, 1998; Siqueira-Junior, 2001; Siqueira-Junior & Roças, 2004a; Gomes *et al.*, 2006a; Sauaia *et al.*, 2006; Delboni, 2009). Procedimentos clínicos insatisfatórios e complexidades anatômicas dificultam a eliminação da infecção (Nair *et al.* 1999a; Lopes *et al.*, 2010b). A falta de uma restauração coronária satisfatória promove uma fonte constante de agentes infecciosos e nutrientes que podem iniciar ou manter a infecção periapical contribuindo para o insucesso da terapia (Ricucci *et al.*, 2000; Sauaia *et al.*, 2006).

Sabendo que os microrganismos são os principais responsáveis pela instalação e manutenção de doenças pulpo-periapicais, é de fundamental importância identificar os microrganismos das infecções endodônticas 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).

Estudos sobre a microbiologia dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais têm aumentado nos últimos anos como podemos notar na literatura (Peciulienė *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003; Siqueira-Junior & Rôças, 2004a; Rôças *et al.*, 2004; Delboni, 2009; Gomes *et al.* 2006a,b ; 2008; Roças *et al.*, 2008; Siqueira-Junior & Rôças, 2008).

Trabalhos utilizando métodos cultura-dependentes mostram uma microbiota bem diferente dos casos de infecção primária. Em casos de retratamento endodôntico há sempre um reduzido número de bactérias, sendo a maioria das espécies facultativas e gram-positivas. Espécies como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp., *Parvimonas micra* e fungos como *Candida albicans* são frequentemente relacionadas com insucessos endodônticos (Sundqvist *et al.*, 1998; Love, 2001; Pineiro *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006b; Delboni, 2009).

O desenvolvimento das técnicas moleculares de identificação microbiana favoreceu o diagnóstico e expandiu o conhecimento sobre a composição da microbiota oral (Gomes & Montagner, 2010). Essas metodologias, baseadas na identificação bacteriana através do gene 16S rRNA, vêm demonstrando uma microbiota mais complexa nos casos de retratamento, com envolvimento também de espécies como *Treponema* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Filifactor alocis* e *Tannerella forsythia*, associadas anteriormente apenas com casos de necrose pulpar e infecção primária (Siqueira-Junior & Roças, 2004a; Gomes *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008; Lourenzo & Mayer, 2010).

Este trabalho visa investigar a presença de *Treponema* spp. em casos de retratamento, contribuindo para a descrição mais detalhada e um melhor entendimento do papel dos microrganismos na etiopatogenia de insucessos endodônticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As principais alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos perirradiculares são de natureza inflamatória e etiologia microbiana, ou seja, os microrganismos e seus produtos metabólicos são os maiores responsáveis pela instalação, desenvolvimento e manutenção das patologias pulpares e periapicais (Takehashi *et al.*, 1965; Soares *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2007; Martinho, 2007; Gomes *et al.*, 2008).

Estabelecida a infecção pulpar, bactérias e suas toxinas avançam em direção aos tecidos perirradiculares. No intuito de conter o avanço da infecção, há uma resposta inflamatória e imunológica por parte do hospedeiro, estando relacionada com a reabsorção óssea que irá caracterizar a lesão periapical visível radiograficamente (Soares, 2002; Leonardo *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2010a).

O sistema imunológico do hospedeiro não tem acesso às bactérias alojadas no interior dos canais radiculares, pois não há mais suprimento sanguíneo na região (Oliveira *et al.*, 2007). Assim, o tratamento endodôntico visa eliminar essa infecção ou romper o equilíbrio desse ecossistema microbiano e dar condições ao organismo para haver o reparo. A máxima eliminação dos microrganismos dos canais radiculares infectados é o grande desafio e tem sido uma constante preocupação na Endodontia, demonstrada por pesquisas que avaliam a eficácia da instrumentação e a influência da irrigação e medicação intracanal (Byström & Sundqvist, 1983; Gomes *et al.*, 1996; Dametto *et al.*, 2005; Berber *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2007).

2.1. Fatores relacionados com o insucesso endodôntico

Quando o tratamento endodôntico é realizado de acordo com critérios rigorosos e controle asséptico, seguindo adequadamente os princípios técnicos e biológicos, a taxa de sucesso é elevada (Sundqvist *et al.*, 1998; Siqueira-Junior, 2001).

Sabe-se que o sucesso está relacionado com a máxima redução do número de bactérias viáveis em uma infecção endodôntica, o que é alcançado pela combinação de fatores mecânicos (instrumentação), químicos e físicos (irrigação-aspiração) durante o preparo e modelagem dos canais radiculares. Isto possibilita uma adequada obturação e selamento hermético dos canais radiculares. Caso contrário, a terapia não resulta na resolução da infecção, caracterizando o insucesso.

Alguns fatores estão relacionados com falhas do tratamento endodôntico e podem influenciar negativamente no reparo após tratamento e prognóstico como: condição pré-operatória, problemas técnicos, infecção persistente ou secundária, qualidade da obturação e selamento coronário, infecção extra-radicular, tamanho da lesão, reação de corpo estranho e presença de cistos (Sundqvist *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1999a,b; Ricucci, 2000; Siqueira-Junior, 2001; Peciulienė *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2004; Sauaia *et al.*, 2006).

2.1.1. Fatores Microbianos

Os fatores microbianos são os principais responsáveis pelo fracasso da terapia. Na maioria dos casos, o insucesso do tratamento endodôntico ocorre devido a procedimentos clínicos insatisfatórios de controle e eliminação da infecção, como a falta de controle asséptico durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (Nair *et al.*, 1999a).

Além dos problemas anatômicos, que consistem em áreas inacessíveis à instrumentação, resultando em permanência de infecção, o fracasso endodôntico pode advir da resistência de determinadas bactérias aos métodos químicos e mecânicos utilizados na terapia endodôntica convencional.

Gomes *et al.* (1996) estudaram a suscetibilidade da microbiota dos canais radiculares ao preparo químico-mecânico, e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar todas as bactérias, apresentando algumas espécies mais

resistentes do que outras, como por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Com o objetivo de comparar o potencial antimicrobiano, mediato e imediato, de algumas soluções irrigadoras utilizadas durante o preparo químico-mecânico, Dametto *et al.* (2005) verificou que bactérias podem permanecer viáveis após o preparo químico-mecânico e recolonizar o canal caso haja condições favoráveis.

Casos de acidentes e complicações, como desvios, formação de degraus, perfurações, fraturas de instrumentos e extravasamento de material obturador, usualmente resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso. Por si só não podem causar ou manter patologia periapical. A sobreobturação é improvável de causar falhas se não estiver associada a bactérias. A presença do cone de guta-percha ultrapassando o forame apical, por exemplo, geralmente não apresenta um selamento satisfatório, permitindo entrada de fluidos teciduais para o interior do sistema de canais radiculares, o que representa substrato para bactérias remanescentes. Estas por sua vez poderão se multiplicar, atingir um número suficiente para alcançar região periapical e tornarem-se virulentas, capaz de induzir ou manter uma lesão (Siqueira-Junior, 2001; Lopes *et al.*, 2010a).

Além do selamento apical adequado, o selamento coronário é de fundamental importância para o sucesso do tratamento endodôntico, pois evita a infiltração de nutrientes para bactérias remanescentes e impede que outras bactérias da cavidade oral colonizem o canal radicular (Molander *et al.*, 1998; Siqueira-Junior, 2001; Ricucci 2000; Sauaia *et al.*, 2006).

Segundo Imura *et al.* (2007) os dentes que permanecem com restauração provisória por tempo prolongado têm um prognóstico duvidoso. A restauração definitiva do elemento dentário deve ser realizada imediatamente após a conclusão do tratamento endodôntico.

Outro fator microbiano relacionado com os insucessos é a presença de infecção extra-radicular. Até mesmo casos considerados radiograficamente satisfatórios e que foram realizados adequadamente dentro dos padrões técnicos e biológicos podem falhar devido a presença do biofilme apical (Siqueira-Junior, 2001; Lorenzo & Cavanague, 2010).

Algumas bactérias são capazes de vencer as defesas do hospedeiro e podem sobreviver nos tecidos periapicais. Arranjadas em biofilme elas se tornam ainda mais resistentes aos agentes antimicrobianos e defesa do hospedeiro. Além disso, estando localizadas na região periapical, em lacunas de reabsorções na superfície externa da raiz, estão fora do alcance do endodontista durante a terapia convencional e procedimentos intracanal (Lopes *et al.*, 2010a).

Leonardo *et al.* (2002) avaliaram a presença de infecção extra-radicular. Os resultados mostraram presença de biofilme apical em todos os dentes portadores de lesão periapical visível radiograficamente estudados, sugerindo sua contribuição para o insucesso devido a possibilidade de persistência dessa infecção após tratamento endodôntico convencional.

2.1.2. Fatores Não-Microbianos

Embora a maioria das evidências aponte para fatores microbianos ligados ao insucesso da terapia endodôntica, alguns casos podem estar relacionados com fatores não microbianos como reações de corpo estranho, presença de cistos e fatores intrínsecos como acúmulo de produtos de degradação tecidual, por exemplo, de cristais de colesterol (Nair *et al.*, 1993, 1999a, b; Molander *et al.*, 1998; Siqueira-Junior, 2001).

Um agente agressor de difícil eliminação do organismo pode resultar em reação de corpo estranho na região periapical. Este é um processo crônico caracterizado pelo acúmulo de macrófagos e formação de células multinucleadas, que poderá perpetuar ou induzir uma lesão periapical levando o tratamento endodôntico ao fracasso. Esses agentes agressores são fatores extrínsecos que podem ser levados aos tecidos periapicais, por exemplo, substâncias irritantes presentes em alguns materiais obturadores, cones de guta-percha contaminados por talco, a celulose presente nos cones de papel absorvente ou algodão e até mesmo alguns alimentos de origem vegetal que podem adentrar o canal caso este seja mantido aberto para drenagem ou selamento temporário é perdido (Siqueira-Junior *et al.*, 2010b).

Fatores intrínsecos como cristais de colesterol, resultante da degradação tecidual, também pode conduzir a uma reação de corpo estranho. As células de defesa do organismo não são capazes de eliminar esses cristais, então há o acúmulo destes perpetuando a lesão periapical (Nair *et al.*, 1999b; Siqueira-Junior, 2001; Rotstein & Simon, 2010).

Nair *et al.* (1993) relatou a possível interferência de fatores endógenos no reparo periapical após tratamento endodôntico. Através da realização de biópsia de uma lesão periapicais assintomática persistente após 44 meses de preservação. Não foi detectada presença de microrganismos e foi encontrado um grande número de cristais de colesterol.

Muitas vezes a ocorrência de cistos também pode ser responsável pela ausência de reparo após tratamento endodôntico, principalmente em casos de cisto verdadeiros onde não há comunicação da loja cística com o canal radicular, sendo estes auto-sustentáveis. (Molander *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1993; 1999a; Lopes *et al.*, 2010b) .

2.2. Microbiota presente nos canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico

A cavidade oral é um ambiente colonizado por uma diversidade enorme de bactérias. Com os avanços tecnológicos e aplicação de metodologias moleculares já foram identificadas cerca de 700 espécies na microbiota bucal, sendo aproximadamente 50% desta ainda não cultivada e apenas uma pequena parte dessa microbiota já foi isolada de canais radiculares (Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Lorenzo & Mayer, 2010).

A presença de microrganismos pertencentes a 6 filotipos, dentre os 11 já identificados na cavidade oral, já foram encontrados em canais radiculares. São eles: Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobactéria, Spirochaetes, Bacteroidetes (Munson *et al.*, 2002; Siqueira-Junior & Roças 2005).

Diversos trabalhos na literatura, utilizando métodos de cultura, mostram que a microbiota encontrada em casos de insucesso endodôntico difere bastante da

microbiota endodôntica em casos de infecção primária. As infecções primárias são geralmente polimicrobianas, com envolvimento de cerca de 5 a 7 espécies por caso. São caracterizadas pelo predomínio de bactérias anaeróbias estritas e gram-negativas (Munson *et al.*, 2002; Soares, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Vianna, 2006; Martinho 2007; Siqueira-Junior *et al.*, 2010). Já os casos de insucesso endodôntico caracterizam-se por uma microbiota menos diversificada, com reduzido número de espécies isoladas por caso, algumas até consideradas monoinfecções. Há predomínio de bactérias facultativas e gram-positivas (Sundqvist *et al.*, 1998; Molander *et al.*, 1998; Siqueira-Junior, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Delboni, 2009).

No interior do canal há alterações ambientais que promovem a seleção de determinadas espécies. Algumas não toleram a nova situação e têm seu número drasticamente reduzido ou até mesmo desaparecerem do habitat, possibilitando o aumento significativo de outras espécies que melhor se adaptaram ao ambiente modificado. Em casos de retratamento, as bactérias que permanecem são capazes de alterar seu metabolismo, adaptando-se às novas condições ambientais, e de crescer dentro de túbulos dentinários (Love, 2001; Gomes *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006b; Gomes *et al.*, 2007; Lorenzo & Cavanague, 2010).

Segundo Sundqvist *et al.* (1998) ocorre um processo de seleção de microrganismos resultando na mudança da microbiota nos casos de insucesso em relação a infecção primária, porém ainda não se sabe se essa seleção é devido a resistência de algumas espécies ao preparo químico-mecânico ou devido a capacidade de sobreviverem em ambiente com restrição nutricional ou outras condições adversas.

As bactérias presentes nos canais de dentes tratados endodonticamente que fracassaram podem ser derivadas tanto da infecção primária, que tenham resistido ao preparo químico-mecânico e/ou medicação intracanal (infecção persistente), quanto podem ter adentrado e contaminado o canal após o tratamento endodôntico através das infiltrações coronárias (infecção secundária) (Sundqvist *et al.*, 1998; Siqueira-Junior 2001; Siqueira-Junior & Roças, 2004a; Gomes *et al.*, 2006a; Sauaia *et al.*, 2006).

A microbiota dos casos de retratamento está provavelmente relacionada à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamentos endodônticos de má qualidade, isto é, limpeza insatisfatória, dentes com obturações muito aquém do ápice ou com falhas, apresentam uma microbiota similar àquela encontrada nos dentes não tratados (Sundqvist *et al.*, 1998 Siqueira-Junior, 2001).

Geralmente as bactérias anaeróbias facultativas gram-positivas são mais resistentes à atividade antimicrobiana do que os anaeróbios gram-negativos, podendo persistir mais freqüentemente em canais radiculares após a terapia endodôntica, mesmo em dentes com tratamento aparentemente satisfatório. Alguns microrganismos facultativos, como o *Enterococcus faecalis*, podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa atividade metabólica por um longo período, e mudanças das condições ambientais, como uma infiltração coronária, pode ativar o seu crescimento (Amorim *et al.*, 2004; Molander *et al.*, 1998; Siqueira-Junior, 2001; Love, 2001).

Love (2001) mostrou que o *E faecalis* foi capaz sobreviver, invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno mesmo na presença de soro humano. Diferente de espécies como *S. mutans* e *S. gordonii* que provavelmente tem seu mecanismo de invasão á dentina afetado pela presença de soro humano. Este mecanismo pode explicar o fato do *E faecalis* ser capaz de reinfetar o canal obturado e representar um importante patógeno em dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Molander *et al.* (1998) estudaram a microbiota de 100 dentes com canais obturados e que apresentavam lesões periapicais visíveis radiograficamente, indicando insucesso do tratamento, e 20 dentes com infecção primária. Os resultados mostraram que bactérias estavam presentes em 68 dentes com insucesso, porém o uso do clorofórmio foi considerado um fator influente e pode ter diminuído o crescimento bacteriano. Dos 21 casos onde foi utilizado o clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas 10 casos (47,3%), enquanto nos 79 dentes restantes, desobturados sem uso solvente, o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Foi observada uma predominância de espécies bacterianas anaeróbias facultativas gram-positivas (69% das amostras identificadas), onde a espécie mais freqüentemente isolada foi *Enterococcus faecalis*. Outras espécies isoladas foram: *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp.,

Peptostreptococcus spp., *Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Escherichia coli*, *Candida albicans* e alguns anaeróbios gram-negativos como *Fusobacterium* spp e *Prevotella* spp. Os autores concluíram que a microbiota dos canais obturados difere qualitativa e quantitativamente das infecções primárias. Enfatizaram a necessidade de novas estratégias de combate à infecção durante o retratamento não-cirúrgico e sugeriram a realização de mais estudos sobre a microbiota de dentes tratados endodonticamente, sua composição e suscetibilidade a substâncias medicamentosas utilizadas no tratamento, com o objetivo de elevar os índices de sucesso.

Sundvist *et al.* (1998) também verificaram a predominância de facultativos gram-positivos, sendo o *E. faecalis* a espécie mais freqüente. Dos 54 casos estudados foram isoladas bactérias de apenas 24 casos. Houve uma taxa de sucesso de 74% nos retratamentos e foi observado que o tamanho da lesão inicial influenciou no reparo.

Com o objetivo de identificar a microbiota dos casos de insucesso endodôntico e verificar associações entre determinadas espécies e características clínicas, Pinheiro *et al.* (2003) estudaram 60 dentes com tratamento endodôntico e lesão persistente. Bactérias foram isoladas de 51 casos, sendo 57% facultativas e 43% estritas. *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente isolada, porém foi significativa a presença de cepas anaeróbias estritas nos casos sintomáticos.

Gomes *et al.* (2004) realizaram um estudo microbiológico de 60 canais, sendo 41 com infecção primária e 19 com infecção secundária, associados a lesões periapicais. A microbiota da infecção primária mostrou um equilíbrio de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a maioria anaeróbias estritas, contendo mais de 3 espécies por canal radicular. Já a infecção secundária apresentou mais bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, com cerca de 1 ou 2 espécies por canal. Foi detectada uma associação entre os casos de insucesso endodôntico e espécies do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pepstreptococcus* e *Fusobacterium*.

Peciulienne *et al.* (2001) avaliaram a microbiota de 40 dentes com insucesso endodôntico. Houve crescimento microbiano em 33 casos e o *E. faecalis* foi isolado em 21 amostras, sendo 11 culturas puras, ou seja, só foi detectado uma espécie. O

fungo *Candida albicans* foi encontrado em 6 casos, sendo em 3 casos associado ao *E. faecalis*.

As metodologias utilizando técnicas de cultura apresentam limitações que podem mascarar a diversidade da microbiota. Algumas bactérias são difíceis de cultivar, pois são bastante exigentes em relação à requerimento gasoso e nutricional. Isso pode representar uma barreira para o melhor entendimento da infecção (Pinheiro *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006a).

Durante a coleta microbiológica o número de células capturadas pode ser pequeno, estando abaixo do necessário para ser detectado em métodos de cultura e assim a prevalência e presença de algumas espécies ficam subestimadas. Em casos de retratamento ainda existem outros agravantes, como a possibilidade da desobstrução eliminar bactérias do interior do canal antes de se fazer a coleta, ou o uso de solventes que pode exercer uma ação antibacteriana sobre as bactérias presentes (Molander *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2001; Siqueira-Junior & Roças, 2004a). Apesar disso, as vantagens dos métodos de cultura estão relacionadas ao seu amplo espectro, o que torna possível identificar uma grande variedade de microrganismos numa mesma amostra, incluindo aqueles que não se esperava encontrar. Além disso, a cultura torna possível determinar a suscetibilidade antimicrobiana destes isolados e estudar sua fisiologia e sua patogenicidade (Shah e Gharbia, 1993; Dahlén, 2002).

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). Essas metodologias vêm demonstrando uma microbiota mais complexa nos casos de retratamento, com envolvimento também de espécies como *Treponema* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Filifactor alocis* e *Tannerella forsythia*, associadas anteriormente apenas com casos de necrose pulpar e infecção primária. Essas espécies podem exercer papel importante na etiopatogenia de insucessos endodônticos, especialmente se elas desenvolvem relações de sinergismo. (Siqueira-Junior & Roças, 2004a; Gomes *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008; Lourenzo & Mayer, 2010).

Dentre as técnicas moleculares podemos destacar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas diversas variações (Nested-PCR, Multiplex PCR, Real-Time Quantitative PCR), Hibridização DNA-DNA (Checkerboard), Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE), Polimorfismo do Comprimento do Fragmento Terminal de Restrição (TRFLP), Clonagem e Sequenciamento. Todas elas são baseadas na identificação bacteriana através do gene 16S rRNA, uma região do DNA bacteriano bastante conservada e sendo assim bem específica para cada espécie (Chan e McLaughlin, 2000; Siqueira-Junior *et al.*, 2001; Clarridge, 2004).

O limite de detecção da cultura é de aproximadamente $10^4 - 10^5$ células, já métodos moleculares como PCR são bem mais sensíveis e podem detectar um número bem baixo de células, cerca de $10 - 10^2$ (Siqueira-Junior & Roças, 2004a; Gomes *et al.*, 2006b).

A grande vantagem desses métodos moleculares é a identificação de bactérias difíceis de cultivar, fastidiosas, algumas incultiváveis até o momento ou cepas com comportamento fenotípico atípico, não podendo ser identificadas fielmente por métodos bioquímicos após a cultura. Entretanto o fato de identificar até mesmo bactérias mortas pode ser uma limitação do método, pois se a bactéria não estava mais viável no sítio da infecção, a sua detecção pode induzir a uma falsa presunção do seu papel no processo infeccioso (Jung *et al.*, 2001; Siqueira-Junior *et al.*, 2001; Foshi *et al.*, 2005 ;Gomes *et al.*, 2006a).

O nested-PCR é uma variação do 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 a 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).

Em 2004, Rôças *et al.* realizaram um estudo para verificar a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em alterações perirradiculares, através de métodos moleculares. Foram feitas coletas de dentes necrosados com lesão periapical

crônica, pericementite, abscesso periapical agudo e casos assintomáticos de insucessos associados com lesão periapical crônica (infecção persistente). Os resultados mostraram presença de *E. faecalis* em 7 dos 21 canais assintomáticos com lesão crônica; 1 de 10 casos de pericementite; 1 de 19 casos de abscesso agudo; 20 de 30 casos de infecção persistente. A referida bactéria foi significativamente mais associada com casos assintomáticos.

Gomes *et al.* (2006b) investigaram a presença de *E. faecalis* em 50 amostras de infecção primária e 50 de secundária, através de cultura e método molecular. A cultura detectou a presença desta espécie em 23 das 100 amostras e o nested-PCR detectou em 79 das 100 amostras. Todos os casos de infecção primária onde foi encontrado *E. faecalis* eram polimicrobianas. Dos 21 casos onde foi detectado *E. faecalis* em infecção secundária, 14 eram monoinfecções.

Siqueira-Junior & Roças (2004a) avaliaram a presença de 19 espécies em 22 casos de dentes indicados ao retratamento endodôntico, através de PCR simples. Em todos os casos foi detectada pelo menos uma espécie gram-positiva. Dois casos apresentaram monoinfecções, um caso com *E. faecalis* e outro com *Pseudoramibacter alactolyticus*. A espécie mais prevalente foi *E. faecalis* (77%), seguida de *P. alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%), *Filifactor alocis* (48%) e *Candida albicans* (9%). Canais radiculares com obturação a mais de 2 mm do ápice radiográfico abrigavam um número maior de espécies.

Foschi *et al.* (2005) investigaram através de PCR a presença de determinadas bactérias (*Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) em canais radiculares com periodontite apical e a associação destas com características clínicas. Todas as espécies estudadas foram detectadas tanto em infecção primária quanto secundária. Houve associação estatisticamente significativa entre a presença de *E. faecalis* e insucesso endodôntico, e entre *T. denticola* e sintomatologia.

Através da aplicação de nested-PCR, com primers espécie-específicos após uma reação inicial com primer universal, Gomes *et al.* (2006a) investigaram a presença de *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola* em necrose pulpar e casos indicados ao retratamento, verificando possíveis associações com sinais e sintomas.

As 3 espécies foram detectadas tanto nos casos de infecção primária quanto secundária. Houve associação entre *F. alocis* e dor, edema, canal com exudato e abscesso; entre *T. forsythia* e sensibilidade a percussão; entre *T. forsythia*, *T. denticola* e mobilidade, exudato e abscesso.

Gomes *et al.* (2008) afirmaram que algumas espécies gram-negativas, que estão relacionadas com infecção primária, também podem estar envolvidas nos insucessos endodônticos, exercendo relações de sinergismo importantes na etiopatogenia dessas lesões persistentes. Neste estudo, a bactéria mais frequente nos casos de insucesso endodôntico com lesão periapical foi o *E. faecalis*, presente em 77,8%. Outras espécies encontradas foram: *Parvimonas micra* (51%), *Porphyromonas gingivalis* (35,6%), *Filifactor alocis* (27,6%), *Treponema denticola* (24,4%), *Porphyromonas endodontalis* (22,2%), *Prevotella intermedia* (11,1%), *Prevotella nigrescens* (11,1%) e *Tannerella forsythia* (4,4%). Verificou-se também associação estatisticamente significativa entre *T. denticola* e *P. micra* com dor a percussão, *P. nigrescens* com dor espontânea e abscesso, *P. endodontalis* e *P. nigrescens* com exudato purulento.

2.3. *Treponemas* spp. nas infecções endodônticas

O gênero *Treponema* inclui bactérias gram-negativas espiraladas, por isso são chamadas espiroquetas, que se apresentam como células delgadas com aproximadamente 0,2 µm de espessura e de 6 a 20 µm de comprimento. Outra característica do gênero é a presença de flagelos, o que lhes confere intensa motilidade. Os *Treponemas* spp. fazem parte microbiota oral, intestinal e genital. Todas as espécies encontradas na cavidade oral são anaeróbias estritas, porém existem algumas outras espécies microaerófilas. Algumas espécies são sacarolíticas, capazes de fermentar carboidratos, e outras utilizam proteínas para obter energia. Coram-se fracamente pelo método da coloração de Gram, então a visualizados por microscopia de campo escuro ou convencional e impregnação por sais de prata é muitas vezes considerada melhor (Lorenzo & Mayer, 2010; Siqueira-Junior *et al.*, 2010a).

Segundo Willis *et al.* (1999) o nested-PCR é mais sensível para detecção de espiroquetas do que a microscopia de campo escuro, particularmente em amostras com baixo número de células.

Os *Treponemas* são microrganismos fastidiosos, ou seja, muito exigentes em relação ao requerimento nutricional, e são também bastante sensíveis ao oxigênio, assim sendo, seu cultivo é extremamente difícil, bem como a diferenciação em nível de espécie. 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, os trabalhos encontrados na literatura sobre prevalência e papel dos *Treponemas* spp. nas infecções (periodontais ou endodônticas) utilizam sempre metodologias moleculares. Dentre as espécies, *T. denticola* é a mais caracterizada e investigada (Choi *et al.*, 1994; Willis *et al.*, 1999; Tsai e Shi, 2000; Siqueira-Junior *et al.*, 2001; Baumgartner *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2009; Montagner *et al.*, 2010).

Alguns importantes fatores de virulência são observados nos *Treponemas*. Por exemplo, a produção de enzimas proteolíticas e o fato de serem dotados de motilidade conferem a essas bactérias um grande poder de penetração tecidual, o que aumenta sua patogenicidade. Também são capazes de inibir a função linfocitária e de neutrófilos polimorfonucleares. Além disso, por serem gram-negativas, apresentam lipopolissacarídeo (LPS) em sua membrana externa. Esta endotoxina tem um significativo efeito tóxico sobre o hospedeiro, exacerbando a resposta inflamatória e potencializando os danos causados (Fenno e McBride, 1998; Tsai e Shi, 2000; Chan e McLaughlin, 2000; Leonardo *et al.*, 2004; Martinho, 2007).

O envolvimento de várias espécies de *Treponemas* com problemas periodontais e sua virulência nessa patologia são fatores bem conhecidos. Os componentes deste gênero podem representar cerca de 50% da microbiota encontrada em biofilme subgengival de pacientes portadores de periodontite (Wyss *et al.*, 1996; Umemoto *et al.*, 1997; Fenno e McBride, 1998; Chan e McLaughlin, 2000).

Muitos patógenos periodontais são frequentemente isolados em infecções endodônticas. O complexo vermelho é um conjunto de 3 bactérias, descrito por

Socranskii *et al.* (1998), fortemente associadas a doença periodontal agressiva. Essas 3 bactérias são *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, e vem sendo também associada a infecções endodônticas (Siqueira-Junior *et al.*, 2000; Roças *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006a).

Siqueira-Junior *et al.* (2000) verificaram a presença de *T. denticola* em 52,4% das amostras de canais radiculares infectados e com lesão periapical estudadas. Levando em consideração esse resultado e o fato de serem importantes patógenos periodontais, os autores sugerem sua participação também na etiopatogenia de lesões periapicais de origem endodôntica.

Siqueira-Junior & Roças (2004b) detectaram *Treponemas* com elevada frequência em casos de abscessos periapicais agudos, principalmente das espécies *T. denticola* e *T. socranskii*.

Baumgartner *et al.* (2003) estudou a ocorrência de *Treponemas* spp. em infecções endodônticas assintomáticas e casos de abscessos endodônticos. Concluíram que a incidência de *Treponemas* spp. foi significativamente maior nos casos de abscessos (60,7%) do que em casos assintomáticos (37%). A espécie mais freqüente foi *T. socranskii*, seguida de *T. maltophilum*, *T. denticola*, *T. pectinovorum* e *T. vicentii*.

Gomes *et al.* (2006a) observaram a presença de *T. denticola* em 24% dos casos de retratamento endodôntico.

Sakamoto *et al.* (2009) demonstraram através de nested-PCR, clonagem e sequenciamento que uma grande variedade de *Treponemas* spp. fazem parte da microbiota envolvida em infecções endodônticas sintomáticas ou não. *T. denticola* foi detectada em 66% dos 90 casos estudados, *T. socranskii* em 37% e *T. maltophilum* em 29%. Outras espécies também foram encontradas, incluindo alguns filotipos ainda não cultiváveis, e não foi detectada associação entre determinadas espécies e sinais e sintomas clínicos.

Foschi *et al.* (2006) estudaram o efeito de monoinfecções com *T. denticola* e infecções polimicrobianas pelo “complexo vermelho” em macacos imunodreprimidos e macacos normais, em relação a disseminação da infecção e indução de perda óssea. Macacos imunodeprimidos e com monoinfecção apresentaram um maior

número de abscessos odontogênicos do que os infectados com o “complexo vermelho”. Os animais com monoinfecção tiveram uma perda óssea foi mais acentua. Esplenomegalia foi verificada em todos os grupos experimentais, e o DNA do *Td* foi detectado por PCR em órgãos como coração, cérebro e baço, indicando disseminação da infecção. Os autores concluíram que o *Td* apresenta elevada patogenicidade.

Montagner *et al.* (2010), através de nested-PCR, investigaram a presença de *Treponema* spp. em canais radiculares infectados e exudato purulento de abscessos periapicais, e avaliaram também a ocorrência de associação positiva entre espécies e sintomatologias. As espécies investigadas foram: *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. médium*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum* e *T. vicentii*. O resultado foi positivo em 18 das 20 coletas do canal e em 19 das 20 coletas do abscesso. As espécies mais encontradas foram *T. socranskii*, *T. denticola*, *T. medium* e *T. amylovorum*. Em nenhuma amostra foi detectado *T. pectinovorum*, e não houve associação entre determinadas espécies e sintomatologia clínica.

Também através de nested-PCR, Siqueira-Junior & Roças (2003) estudaram a ocorrência de *T. maltophilum*, *T. lecithinolyticum*, *T. amylovorum* e *T. medium* em casos de infecção primária com envolvimento perirradicular, sintomáticos ou não. *T. maltophilum* foi o mais prevalente, detectado em 39% dos casos (50% dos casos sintomáticos e 33% assintomáticos), seguido de *T. lecithinolyticum* encontrado em 26% dos casos (10% sintomáticos e 33% assintomáticos), *T. medium* em 13% (10% sintomáticos e 14% assintomáticos) e *T. amylovorum* em 7% dos casos (10% sintomáticos e 5% assintomáticos). Nenhuma espécie esteve significativamente associada com sintomatologia.

Duas novas espécies, *T. parvum* e *T. putidum*, foram detectadas em canais radiculares por Roças & Siqueira-Junior (2005).

Até o presente momento 10 espécies de *Treponemas* orais foram cultivadas: *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. médium*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T.vicentii*, *T lecithinolyticum*, *T. parvum* e *T. putidum* (Wyss *et al.*, 1996; Siqueira-Junior *et al.*, 2010a). Todas elas já foram detectadas em infecções endodônticas primária por métodos moleculares, porém a literatura carece de

trabalhos que investiguem a presença de *Treponemas* spp. também em casos de insucesso endodôntico.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Investigar a presença de *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. médium*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* em casos de dentes com insucesso do tratamento endodôntico e lesão periapical através de Nested-PCR.
- Correlacionar o número de espécies detectadas e o tamanho da lesão periapical.
- Verificar possíveis correlações entre a ocorrência das espécies, e entre determinadas espécies e características clínicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extração de DNA bacteriano das coletas clínicas

Foram utilizadas 40 coletas clínicas pertencentes ao Banco de Coletas do Laboratório de Microbiologia aplicada a Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Todas as coletas eram de canais radiculares que apresentavam insucesso do tratamento endodôntico e lesão periapical, e estavam armazenadas na temperatura de -20°C para conservação do DNA bacteriano. Os procedimentos de coleta já foram descritos previamente (Delboni, 2009). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (Anexo).

Os tubos contendo VMGA III e o cone de papel absorvente (coleta clínica) foram colocados no agitador de tubos (MA 162-MARCONI, São-Paulo, Brasil) por 60 segundos. Após agitação foram removidos 300 µL do VMGA III para a extração do DNA com o kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) (Figura 1) de acordo com as instruções do fabricante. Este kit é específico para essa função e compreende uma série de tampões, centrifugações e filtragens para que o DNA seja extraído e no final re-suspendido em uma solução eluente para que possa ser armazenado a -20 °C. Após extração, a concentração do DNA de cada amostra foi quantificado através do espectrofotômetro para ácidos nucleicos NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) a fim de verificar o sucesso do procedimento de extração de DNA e sua concentração.



Figura 1 - Kit para extração de DNA “QIAamp DNA mini kit”

4.2. Nested-PCR

4.2.1. Reação de PCR Universal

Para realização do Nested-PCR é necessário inicialmente a amplificação do gene 16S rRNA através da reação de PCR com Primer Universal:

Univ Forward	5' GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'
Univ Reverse	5' GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA 3'

A reação foi realizada empregando-se uma mistura com volume total de 50µL. A quantidade de DNA e água deve somar um total de 37 µL, que somados com 13 µL do mix resulta no volume total da reação de 50 µL. O ideal é que a reação seja feita com uma concentração de DNA entre 50 a 100 ng/µL. Devido à pequena concentração de DNA de nossas amostras após a extração, foi utilizada uma alíquota de 10 µL na reação de PCR.

O mix de reagentes era composto por 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 (Figura 2).



Figura 2 – Componentes para reação de PCR

Os parâmetros do ciclo para amplificação foram os seguintes:

Desnaturação inicial _____ 94°C por 4 min
 30 ciclos: Denaturação _____ 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

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 0,5 μ L de brometo de etídio (10mg/ml), por aproximadamente 45 minutos a 90V e temperatura ambiente em um tampão TAE 1X. Foram colocados 4 μ L do produto de PCR misturados com 2 μ L de corante (BlueJuice Gel Loading Buffer – Invitrogen) em cada poço do gel (Figura 3). Foi usado marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen) já que a reação resultou em um produto com 1500 pares de base.



Figura 3 – Cuba de eletroforese contendo o gel com as amostras nos poços.

Após a eletroforese, o gel era observado sob luz UV para verificar a presença das bandas, e a imagem era então fotografada e gravada (Figura 4). As reações foram consideradas positivas se bandas do tamanho apropriado estiverem presentes. Foi utilizado um controle positivo com DNA extraído de uma bactéria ATCC, para comprovar se a reação estava realmente correta, e um controle negativo, onde não era acrescentado DNA bacteriano, para verificar se não havia contaminação de nenhum dos reagentes ou água MiliQ utilizada.

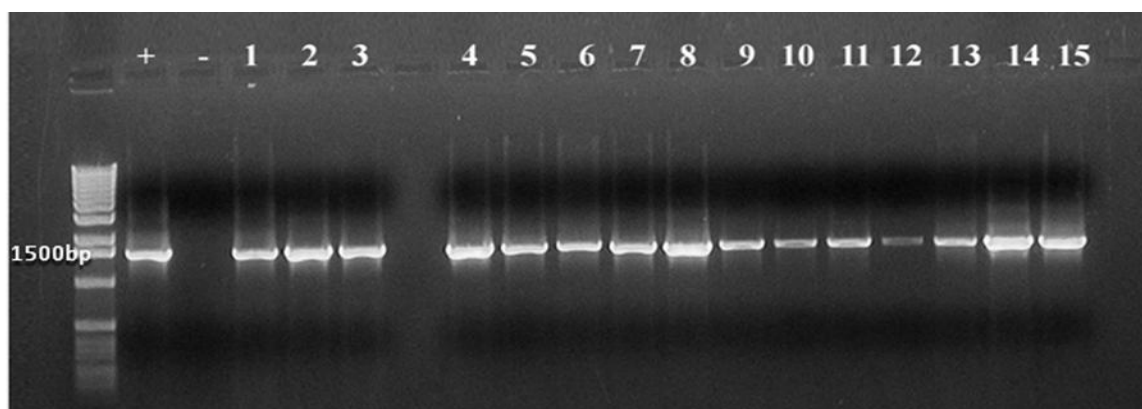


Figura 4 – Resultado da eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da amplificação do DNA bacteriano de 15 amostras testadas, com o controle positivo e negativo.

4.2.2. Reação de PCR com Primers Específicos para *Treponema* spp.

Verificado o sucesso da reação universal, uma alíquota do produto desta reação era utilizada para realização de outra reação PCR, agora usando um primer espécie-específico.

As espécies de treponemas investigadas foram *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. médium*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T. vicentii*, *T. lecithinolyticum*. Seus respectivos primers específicos, tamanho do fragmento amplificado, bem como os parâmetros de cada ciclo (Desnaturação Inicial; 36 Ciclos contendo Desnaturação, Anelamento e Extensão; Extensão Final) encontram-se na tabela 1 (Willis *et al.*, 1999).

Tabela 1 – Primers espécie-específicos utilizados, tamanho do fragmento amplificado e parâmetros de ciclos da reação de PCR.

Espécie	Primer	Pares de Base	Ciclo
<i>T. denticola</i>	F: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T R: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. amylovorum</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: CTC ACG CCT TTA TTC CGT GAG	193 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 54°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. maltophilum</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: CCT ATT GTG CTT ATT CAT CAG GC	438 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 54°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. médium</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: CCT TAT GAA GCA CTG AGT GTA TTC	192 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 54°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. socranskii</i>	F: GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A R: TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	285 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 56°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. pectinovorum</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: ATA TAT CTC CAA CTT ATA TGA CCT	194 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 53°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. vicentii</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: AAT ACT TCT TAT GAA CAT TGA GAC	193 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 56°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.
<i>T. lecithinolyticum</i>	F: CTT GCT CCT TTC TGA GAG TGG CGG R: ACG CAT CCG TAT CTC TAC GAA CTT	950 bp	95°C por 2min; 36 ciclos: 94°C por 30s, 56°C por 1min, 72°C por 2min; 72°C por 10min.

O volume total dessas reações era 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 que era composto por 2,5µL de Buffer 10X PCR; 1,25µL de Cloreto de Magnésio; 0,5µL de dNTP; 0,25µL do Primer F (25 pMol); 0,25µL do Primer Univ R (25 pMol); 0,125µL de Platinum Taq DNA Polymerase.

De maneira semelhante como foi feito na reação universal inicial, após essa segunda reação com primers específicos, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (Figura 5). Foi usado marcador

molecular de 100 bp (Invitogen) já que a reação resultou em um produtos variando entre 193 á 950 pares de base.

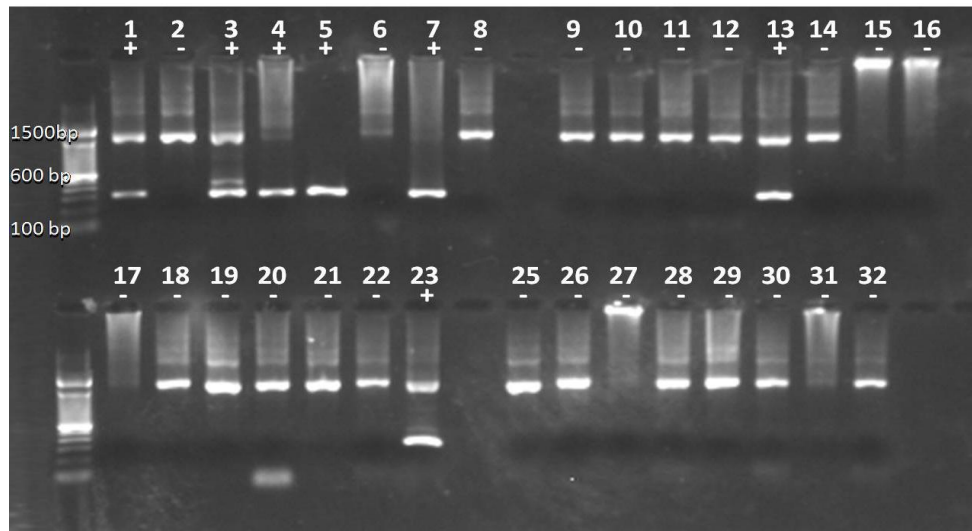


Figura 5 – Resultado da eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da reação com o primer para *T. denticola* de 32 amostras.

Os dados foram tabulados e submetidos a análise estatística através dos programas SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illionis, USA) e BioEstat (CNPQ, 2000, Brasília, DF, Brasil). Foi analisada a associação entre as espécies de *Treponema*, e a relação entre a presença da espécie e sintomatologia clínica através do teste Chi-Square de Pearson ou Teste exato de Fisher, com nível de confiança de 95%. Para correlacionar o tamanho da lesão periapical com o número de espécie de *Treponema* presente no canal foi aplicado o teste de Correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

As características clínicas e radiográficas de cada caso já foram descritas anteriormente por Delboni em 2009, e encontram-se no tabela 2. Uma amostra (caso clínico 25) apresentou resultado negativo na reação universal inicial, ou seja, não foi detectada presença de banda no gel. Essa amostra foi então descartada e não foi utilizada nas demais reações.

Tabela 2 – Características clínicas e radiográficas dos 39 casos estudados.

Caso Clínico	Dor Prévia	Dor Percussão	Fístula	Qualidade Obturação	Qualidade Restauração	Diâmetro Lesão	Pino
1	Sim	Sim	Sim	Ruim	Ruim	6 mm	Não
2	Não	Sim	Não	Ruim	Boa	2 mm	Sim
3	Não	Não	Não	Boa	Boa	20 mm	Sim
4	Não	Não	Não	Boa	Boa	3 mm	Não
5	Não	Não	Não	Boa	Boa	3 mm	Não
6	Não	Não	Não	Boa	Ruim	4 mm	Não
7	Não	Sim	Não	Ruim	Boa	2 mm	Sim
8	Não	Não	Não	Ruim	Boa	2 mm	Sim
9	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	5 mm	Não
10	Não	Não	Não	Ruim	Boa	5 mm	Sim
11	Não	Não	Não	Boa	Boa	5 mm	Sim
12	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	10 mm	Não
13	Não	Não	Sim	Ruim	Boa	3 mm	Não
14	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	20 mm	Sim
15	Não	Não	Não	Ruim	Boa	20 mm	Sim
16	Não	Não	Não	Boa	Boa	5 mm	Não
17	Não	Não	Sim	Boa	Ruim	10 mm	Não
18	Não	Não	Não	Boa	Boa	3 mm	Não
19	Não	Sim	Não	Ruim	Ruim	3 mm	Não
20	Não	Sim	Não	Ruim	Boa	3 mm	Sim
21	Não	Sim	Não	Ruim	Ruim	4 mm	Sim
22	Sim	Sim	Não	Ruim	Ruim	4 mm	Sim
23	Sim	Sim	Sim	Boa	Ruim	20 mm	Não
24	Não	Sim	Não	Ruim	Ruim	40 mm	Não
25	Não	Sim	Não	Boa	Ruim	40 mm	Não
26	Não	Sim	Não	Ruim	Ruim	40 mm	Não
27	Não	Não	Sim	Ruim	Ruim	10 mm	Não
28	Sim	Não	Não	Ruim	Boa	4 mm	Sim
29	Não	Sim	Sim	Ruim	Ruim	3 mm	Não
30	Não	Não	Não	Boa	Boa	3 mm	Não
31	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	3 mm	Sim
32	Não	Não	Não	Ruim	Boa	5 mm	Não
33	Sim	Não	Não	Boa	Boa	4 mm	Sim
34	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	2 mm	Sim
35	Não	Não	Não	Boa	Ruim	3 mm	Sim
36	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	4 mm	Não
37	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	2 mm	Sim
38	Não	Não	Não	Boa	Boa	8 mm	Não
39	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	2 mm	Não
40	Não	Não	Não	Ruim	Ruim	1 mm	Sim

Todos os casos apresentavam lesão periapical, sendo maior ou igual a 4 mm em 55% dos casos. Sintomatologia foi observada em 42,5% dos casos, sendo 5 casos de dor prévia e 12 casos de dor a percussão. Retentor intra-radicular esteve presente em 45% dos casos. A qualidade da obturação foi considerada boa e a restauração satisfatória em 35% e 45% dos casos respectivamente.

Das 39 amostras processadas nas reações com primers específicos, em 17 casos (43,5%) não foi detectada a presença de nenhuma das 8 espécies estudadas. Em 22 casos (56,5%) pelo menos uma espécie foi detectada. O número máximo de espécies detectadas no mesmo canal foi 6, ocorrendo em apenas 1 amostra. Três amostras apresentaram resultado positivo para 5 espécie, 2 amostras apresentaram 4 espécies, 4 amostras 3 espécies, 8 amostras 2 espécies e 4 amostras apresentaram resultado positivo para apenas 1 espécie (Gráfico 1). Não houve correlação entre o número de espécies detectadas e o tamanho da lesão periapical ($p>0,05$).

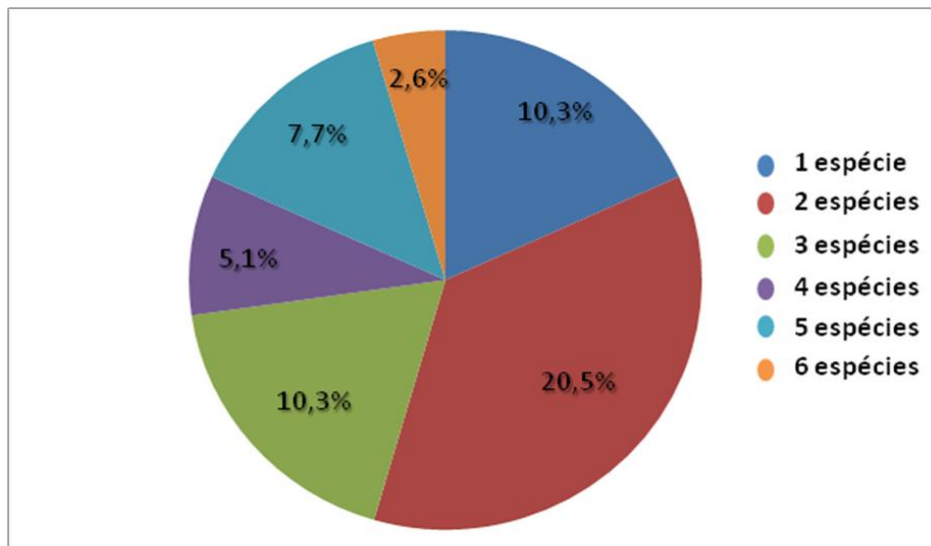


Gráfico 1 – Porcentagem de casos que apresentaram 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 espécies diferentes de *Treponema*.

As espécies mais frequentemente detectadas foram *T. denticola* e *T. maltophilum*, presentes em 30,8% dos casos. O gráfico 2 mostra a frequência com que cada espécie esteve presente nas 39 amostras de canais radiculares com insucesso endodôntico estudadas.

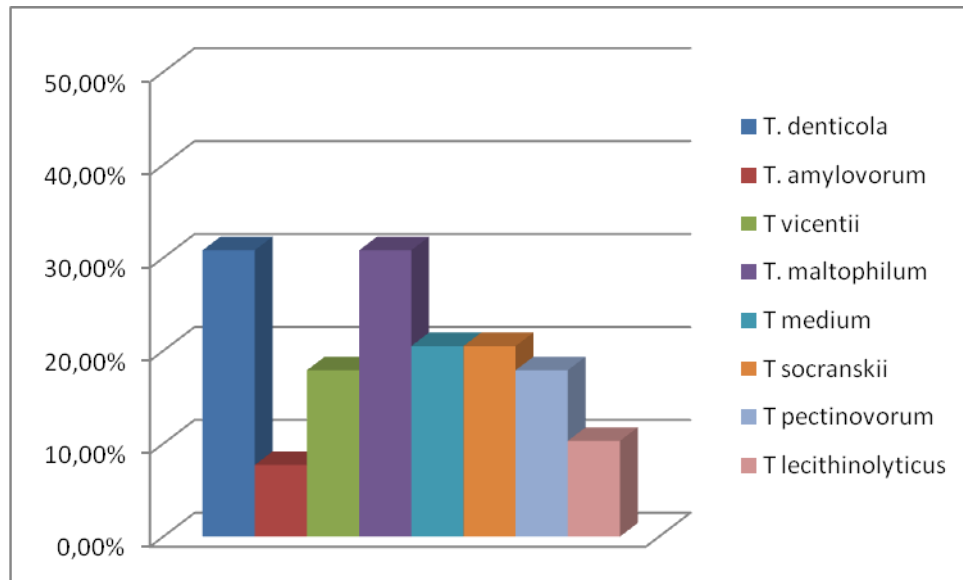


Gráfico 2 – Frequência de ocorrência dos Treponemas

Foi observada associação positiva ($p < 0,05$) entre *T. denticola* com *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*; entre *T. medium* e *T. socranskii*, *T. maltophilum*; entre *T. maltophilum* e *T. socranskii*, *T. lecithinolyticum*. Verificou-se correlação entre ocorrência de *T. lecithinolyticum* e presença de retentor intra-radicular ($p < 0,05$), porém não houve correlação entre a presença de determinadas espécies e sintomatologia ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A aplicação das metodologias moleculares expandiram bastante o conhecimento sobre a microbiologia endodôntica. Muitas espécies antes desconhecidas, que até o momento não haviam sido isoladas de canais radiculares ou considerados não cultiváveis, passaram a ser identificadas em amostras coletadas dos diversos tipos de infecções endodônticas, colaborando para melhor identificação e compreensão da patogenicidade da microbiota dessas infecções. Assim, pode-se perceber que a microbiota oral e endodôntica é ainda mais complexa do que descrita por estudos anteriores, inclusive em casos de retratamento (Peciulienė, *et al.*, 2001; Siqueira-Junior & Roças, 2004a, b; 2005; Foschi *et al.*, 2005; Siqueira-Junior *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008; Delboni, 2009). Nossos resultados também sugerem uma maior diversidade da microbiota em casos de insucesso.

Segundo Dahlén (2002), o método de cultura microbiana é considerado o “padrão ouro” para a avaliação microbiológica das infecções odontogênicas. A cultura realmente representa uma valiosa ferramenta para a microbiologia clínica, entretanto, para avaliação de diversidade da microbiota, os métodos mais indicados são os que envolvem biologia molecular devido a sensibilidade das técnicas (Jung *et al.*, 2001; Pinheiro, *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006b; Gomes *et al.*, 2008).

Percebe-se na literatura um grande número de trabalhos abordando a microbiologia em casos de insucesso. Peciulienė *et al.* (2001) sugere que este fato esteja relacionado com os baixos níveis de sucesso comparados com as infecções primárias. Conhecendo bem o perfil microbiano da infecção podemos tratá-la melhor, pois a estratégia para se combater uma infecção deve ser baseada no conhecimento da microbiota (Molander, *et al.* 1998).

Alguns trabalhos revelaram ausência de microrganismos em casos de retratamento. Apesar de se acreditar que o maior responsável pelos insucessos sejam os microrganismos, nesses casos não podemos descartar a possibilidade de cistos verdadeiros ou reações de corpo estranho (Molander *et al.*, 1998; Nair, 1999a; Peuciliene, *et al.*, 2001). No presente trabalho o DNA bacteriano foi detectado, através da reação universal inicial, em 39 amostras. Apenas 1 amostra não apresentou banda após o PCR, provavelmente devido problemas durante a extração

do DNA. Não acreditamos que houvesse ausência de bactérias nesta amostra, pois Delboni (2009) apresentou anteriormente resultados de cultura microbiana dessas amostras, e verificou crescimento em todas elas.

A metodologia utilizada neste trabalho, o nested-PCR, apresentam vantagens e desvantagens. É um método altamente sensível e por isso muito susceptível a contaminação. Por isso é de extrema importância a realização do controle negativo durante a realização das reações, tanto a universal inicial quanto as específicas subsequentes. (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 nossos controles negativos apresentaram resultados negativos, assegurando a ausência de contaminação e fidelidade de nossos resultados positivos.

A aplicação de métodos moleculares possibilitaram a identificação de bactérias difíceis de cultivar ou que antes pensava-se não estarem relacionadas com infecções endodônticas, tanto primária quanto secundária. Isso despertou curiosidade e muitas investigações surgiram. Por exemplo os *Treponemas* spp., espécies relacionadas com doença periodontal, passaram a ser investigadas e vêm se mostrando freqüente também 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).

O presente trabalho detectou *Treponemas* spp. em 56,5% das amostras. Diversos trabalhos na literatura também já identificaram, com certa freqüência, varias espécies do gênero *Treponema* em infecções endodônticas primárias sintomáticas e com abscessos ou casos assintomáticos com lesão periapical (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). Nenhum trabalho até o momento havia estudado a presença de *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* em casos de insucesso endodôntico.

A maioria dos trabalhos na literatura aponta uma maior ocorrência de *Treponemas* spp. em casos agudos, indicando sua elevada patogenicidade, fato que

pode sugerir a associação de determinadas espécies com sinais e sintomas (Baumgartner *et al.*, 2003; Siqueira-Junior & Roças, 2004b; Foschi *et al.*, 2006; Gomes, *et al.*, 2006a). Entretanto, nós não verificamos correlação entre a presença de determinadas espécies e sintomas, nem correlação entre o número de espécies detectadas e o tamanho da lesão periapical, estando de acordo com alguns estudos anteriores (Peciulienė *et al.*, 2001; Siqueira-Junior & Roças, 2003; Sakamoto *et al.*, 2009; Montagner *et al.*, 2010).

As espécies mais freqüentes foram *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. socranskii* e *T. medium*, concordando com os resultados de Baumgartner *et al.* (2003), Siqueira-Junior & Roças (2003) e Sakamoto *et al.* (2009). *T. amylovorum* foi a espécie menos freqüente, discordando dos achados de Montagner *et al.* (2010), onde *T.a* foi uma das mais prevalentes. Já em relação ao *T. pectinovorum*, nós o detectamos em 7 amostras e no trabalho de Montagner *et al.* (2010) esta espécie não foi detectada. Todavia, ao compararmos nossos resultados com esses outros trabalhos na literatura, devemos levar em consideração o fato de que eles estudaram infecções primárias, e então não podemos desconsiderar as alterações que fatores de seleção podem provocar na microbiota em infecções secundárias (Sundqvist *et al.* 1998; Gomes *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006b; Lorenzo & Cavanague, 2010). A literatura é escassa em relação a trabalhos de investigação de *Treponemas* em casos de retratamento endodôntico, apenas encontramos relatos de *T. denticola* em retratamentos. Gomes *et al.* (2006a) verificaram presença desta espécie em 24% das amostras estudadas, resultado semelhante ao nosso trabalho.

Alguns autores discutem a importância de se colocar uma barreira sobre o material obturador remanescente em casos de preparo para pino, a fim de evitar infiltração, e a realização imediata do selamento coronário (Suaia *et al.*, 2006). A presença de retentores intra-radulares algumas vezes é apontada como uma possível via de contaminação. Nossos resultados mostraram uma correlação significativa entre a ocorrência de *T. lecithinolyticum* e presença de retentor intra-radicular ($p < 0,05$).

Diante dos resultados obtidos e de acordo com o levantamento bibliográfico realizado, é importante ressaltar que a maioria das metodologias moleculares informa apenas a presença ou ausência de determinadas bactérias. Devemos

atentar para a interpretação dessas informações, pois número de células encontradas pode ser significativo em relação ao papel de cada espécie na etiopatogênia das alterações pulpares e periapicais. Algumas bactérias podem representar apenas um papel ecológico enquanto outras estão diretamente ligadas aos danos causados ao hospedeiro. Outro aspecto importante é a associação de metodologias para o estudo da microbiota endodôntica (Gomes *et al.*, 2006b; Gomes *et al.*, 2008).

Delboni (2009) sugeriu, para melhor entendimento dos insucessos endodônticos, que futuros trabalhos investiguem a correlação da microbiota de diferentes sítios orais, no intuito de esclarecer a origem da microbiota dos casos de retratamento. Para que possamos saber se os principais responsáveis pelos insucessos são bactérias que resistiram ao preparo químico-mecânico e/ou medicação intracanal, permanecendo no canal (infecção persistente), ou são aquelas que por infiltração causaram a recontaminação do canal radicular (infecção secundária) (Sundqvist *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2006b; Gomes *et al.*, 2008).

Com certeza novos microrganismos ainda serão identificados. Entretanto 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).

De qualquer maneira, as interações bacterianas parecem ser o elemento chave para o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos no seu habitat e conseqüente capacidade de produzir doença. Além disso, a complexidade do sistema de canais radiculares favorece o surgimento de uma comunidade microbiana bastante diversificada. As técnicas de coleta e processamento laboratorial, tanto de cultivo quanto moleculares, apresentam limitações intrínsecas. Assim, para um diagnóstico ideal seria necessário o uso conjunto de metodologias que fornecem resultados de detecção, caracterização e quantificação para desenhar de forma mais completa o perfil das comunidades microbianas relacionadas às infecções endodônticas em suas diversas modalidades: infecções primárias sintomáticas e assintomáticas, infecções secundárias e persistentes (Jung *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2008; Gomes & Montagner, 2010).

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, e pela metodologia proposta podemos concluir que:

- Espécies do gênero *Treponema* foram identificadas em 56,5% das amostras de canais radiculares com insucesso endodôntico e lesão periapical estudadas, o que pode indicar que a microbiota dos casos de insucesso endodôntico parece ser mais complexa do que se acreditava anteriormente.
- As espécies mais frequentes foram *T. denticola* e *T. maltophilum*, seguidas de *T. socranskii*, *T. medium*, *T. vicentii*, *T. pectinovorum*, *T. lecithinolyticum* e *T. amylovorum*.
- Não houve correlação entre o número de espécies detectadas e o tamanho da lesão periapical ($p>0,05$).
- Verificou-se correlação entre ocorrência de *T. lecithinolyticum* e presença de retentor intra-radicular ($p<0,05$).
- Não foi observada correlação entre a presença de determinadas espécies e sintomatologia ($p>0,05$).
- Foi observada associação positiva ($p<0,05$) de *T. denticola* com *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*; entre *T. medium* e *T. socranskii*, *T. maltophilum*; entre *T. maltophilum* e *T. socranskii*, *T. lecithinolyticum*.

REFERÊNCIAS*

- Amorim CVG, Aun CE, Mayer MPA. Susceptibility of some oral microorganisms of chlorhexidine and paramonochlorofenol. **Braz Oral Res.** 2004; 18(3): 242-6.
- Baumgartner JC, Lhemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (*Treponemes*) in endodontic infections. **J Endod.** 2003; 29(12): 794-7.
- Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA *et al.* Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canal and dentinal tubules. **Int Endod J.** 2006; 39: p. 10-7.
- Bystrom A; Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5% sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg.** 1983; 55(3): 307-12.
- Chan ECS, McLaughlin R, Taxonomy and virulence of oral spirochetes. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15: 1-9.
- Choi BK, Paster BJ, Dewhirst FE, Gobel UB. Diversity of cultivable and unculturable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. **Infect Immun.** 1994; 62(5): 1889-95.
- Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev.** 2004; 17(4): 840-62.
- Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. **Periodontology 2000.** 2002; 28(1): 206-39.
- Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2005; 99(6): 768-72.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Delboni MG. **Identificação dos microrganismos presentes na saliva, na coroa dental e no canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico e análise da suscetibilidade antimicrobiana, dos fatores de virulência e da diversidade genética dos *Enterococcus faecalis* isolados** [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009

Fenno JC, McBride BC, Virulence factor of oral *Treponemes*. **Anaerobe**. 1998; 4: 1-17.

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.

Gomes BPFA, 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 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 BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *terponema denticola* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. **J Endod**. 2007; 33(9): 1049-52.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA *et al.* Microbiological examination of infect dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**. 2004; 19: 71-6.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **J Endod**. 2008; 34(5): 537-40.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR *et al.* *Enterococcus faecalis* in dental root canals detect by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006b; 102: 247-53.

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment; a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. **J Endod.** 2007; 33(11): 1278-82.

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.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1965; 20: 340-9.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J Endod.** 2002; 28(12): 815-8.

Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. **J Appl Oral Sci.** 2004; 12(2): 93-98.

Lopes HP, Siqueira-Junior JF, Elias CN, Prado MAR. Acidentes e complicações em endodontia. *In:* Lopes HP, Siqueira-Junior JF. **Endodontia: biologia e técnica.** 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2010a.p. 507-30.

Lopes HP, Siqueira-Junior JF, Elias CN, Roças IN. Retratamento endodôntico. *In:* Lopes HP, Siqueira-Junior JF. **Endodontia: biologia e técnica.** 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2010b.p. 691-738.

Lorenzo JL, Cavenague GS. Infecções endodônticas. *In:* **Microbiologia, Ecologia e Imunologia aplicadas à Clínica.** São Paulo: Atheneu; 2010. P. 395-418.

Lorenzo JL, Mayer MPA. Componentes Bacterianos da microbiota Bucal. *In*: Lorenzo JL. **Microbiologia, Ecologia e Imunologia aplicadas à clínica**. São Paulo: Atheneu; 2010. p. 33-42.

Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**. 2001; 34: 399-405.

Martinho FC. **Análise microbiológica, quantificação de endotoxina de dentes com infecções endodônticas primárias e susceptibilidade antimicrobiana** [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.

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 FGC, Gomes BPFA. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudate. **J Endod**. 2010; 36(11): 1796-9.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J Dent Res**. 2002; 81(11): 761-66.

Nair PN. Cholesterol as an aetiological agent in endodontic failures – a review. **Aust Endod J**. 1999a; 25(1): 617-27.

Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1999b; 87: 617-27.

Nair PNR, Sjögren U, Schimacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post treatment follow-up. **Int Endod J** 1993; 26, 225-33.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC. Microrganismos causadores de infecções pulpares e periapicais. *In*: Jorge AOC. **Microbiologia Bucal**. 3 ed. São Paulo: Santos; 2007. p. 127-142.

Peciuliene V, Reynaund AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**. 2001; 34: 429-434.

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.

Ricucci D, Grondal K, Bergenholtz G. Periapical status of root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2000; 90(3): 354-9.

Roças IN, Baumgartner C, Xia T, Siqueira-Junior JF. Prevalence of selected bacterial named species and uncultured phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. **J Endod**. 2006; 32(12):1135-8.

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.

Roças IN, Siqueira-Junior JF, 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; 91:468-71.

Rotstein I, Simon JH Inter-relação endodontia e periodontia. In: Lopes HP, Siqueira-Junior JF. **Endodontia: biologia e técnica**. 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2010.p. 891-922.

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.

Sauaia TS, Gomes BPFA, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microleakage evaluation of intraorifice sealing materials in endodontically treated teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006; 102(2): 242-6.

Shah HN, Gharbia SE. Studies on the physiology and ecology of black-pigmented Gram-negative anaerobes which may be important in disease development. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 1993; 6(2-3): 165-72.

Siqueira-Junior JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J.** 2001; 34: 1-10.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. **J Endod.** 2005; 31(7): 488-98.

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-Junior JF, Roças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2004a; 97: 85-94.

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

Siqueira-Junior JF, Roças IN, Faveri A, Santos KRN. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infection by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15: 335-7.

Siqueira-Junior JF, Roças IN, Lopes HP. Microbiologia endodôntica. In: Lopes HP, Siqueira-Junior JF. **Endodontia: biologia e técnica.** 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2010a. p. 103-46.

Siqueira-Junior JF, Roças IN, Lopes HP. Patologia pulpar e periapical. In: Lopes HP, Siqueira-Junior JF. **Endodontia: biologia e técnica.** 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2010b. p. 21-82.

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.

Soares JA. Microbiota dos canais radiculares associada às lesões periapicais crônicas e sua significância clínica. **J Bras Endod**. 2002; 3(9): 106-117.

Soares JA, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru-Filho M, Ito Y. Eliminations of intracanal infection in dogs' teeth with induced periapical lesions after rotatory instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes. **J Appl Oral Sci**. 2006; 14(3): 172-177.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Microbial complexes in subgingival plaque. Smith C, Kent RL Jr. **J Clin Periodontol**. 1998; 25(2): 134-44.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1998; 85(1): 86-93.

Tsai JP, Shi W. Analysis if gene expression in *Treponema denticola* with differential display polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol**. 2000; 15: 305-8.

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.

Vianna ME. **Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas** [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2006.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. **Oral Microbiol Immunol**. 2007; 22(6): 411-8.

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 bacteriol.** 1996; 46(3): 745-52.



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 "**Análise microbiológica e estudo de endotoxinas de canais radiculares infectados**", protocolo nº 103/2008, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Frederico Canato Marinho, Letícia Maria Menezes Nóbrega, Thais Mageste Duque e Wanderson Miguel Maia Chiesa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 16/12/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Microbiological analysis and investigation of endotoxin in infected root canals**", register number 103/2008, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Frederico Canato Marinho, Letícia Maria Menezes Nóbrega, Thais Mageste Duque and Wanderson Miguel Maia Chiesa, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 12/16/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

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