



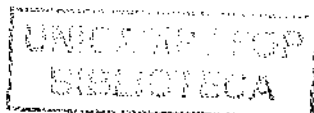
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA Monografia de Final de Curso

Aluna: Ana Clara Fagundes Pedroni
Orientadora: Profa Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Ano de Conclusão do Curso
2009



Assinatura da Orientadora.

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several loops and flourishes.

Ana Clara Fagundes Pedroni

**Investigação da presença dos microrganismos *Treponema denticola*,
Porphyromonas gingivalis e *Tannerella forsythia* em dentes com
infecções endodônticas primárias antes e após o preparo químico-
mecânico**

***Investigation of the presence of the microorganisms Treponema
denticola, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in
teeth with primary endodontic infections before and after the
chemomechanical preparation***

Monografia apresentada ao Curso de
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba – UNICAMP,
para obtenção do Diploma de Cirurgião
Dentista.

Orientadora: Profa Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Piracicaba

2009

Unidade - FOP/UNICAMP

TCC/UNICAMP

P 343i Ed.

Vol. Ex.

Tombo 4984

C ☐ D ☒

Proc. 16P-1354/10

Preço R\$ 11,00

Data 13/08/10

Registro 772678

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

P343i Pedroni, Ana Clara Fagundes.
Investigação da presença dos microrganismos
Treponema denticola, *Porphyromonas gingivalis* e
Tannerella forsythia em dentes com infecções endodônticas
primárias antes e após o preparo químico-mecânico. / Ana
Clara Fagundes Pedroni. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.
34f. : il.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Bactérias. I. Gomes, Brenda Paula
Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III.
Título.

(mg/fop)

Dedico à minha família, em especial
minha mãe Deni e avós Júlio e Zulmira,
por todo o amor, confiança no meu
sucesso e apoio em minhas conquistas.
A Carlos R.N.Filho, por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e todas as oportunidades que me proporciona diariamente.

A Prof^a Brenda pela habilidade com a qual dirigiu meu trabalho e apoio ao projeto.

A co-orientadora Morgana Eli Vianna pela fundamental ajuda e incentivo para o desenvolvimento do projeto.

A todos os alunos, estagiários e professores do laboratório de microbiologia endodôntica pela colaboração. Em especial Giovânia e Bruna Piovesana.

Aos amigos queridos, Bruna Piovesana, Débora Moreira, Fernanda Kobayash Gabriel Jordão, Gisele Ramos, Natália Aialla e Natália Furlan, por serem os companheiros de todos os dias. A melhor parte que sempre terei desses anos, amigos que aprendi a amar.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	7
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	8
Resumo.....	9
1. Introdução.....	10
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1. Complexo vermelho.....	12
2.1.2. Complexo vermelho na cavidade oral.....	12
2.1.3. Bactérias do complexo vermelho na endodontia.....	13
3. Material e Método.....	15
3.1. Extração do DNA.....	16
3.2. Reações de PCR.....	17
3.3. Eletroforese.....	20
3.4. Análise estatística.....	20
4. Resultados.....	21
5. Discussão.....	26
6. Conclusão.....	29
Referências.....	30
Anexos.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eletroforese das bandas geradas pela amplificação por PCR, com os primers específicos para as bactérias: a) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (404 bp), b) <i>Tannerella forsythia</i> (641 bp) e c) <i>Treponema denticola</i> (316 bp) respectivamente.	21
Figura 2: Porcentagem encontrada das espécies que compõem o complexo vermelho, quando em associação das 3 espécies e quando dissociadas, em 24 casos de infecções endodônticas primárias.	22
Figura 3: Ocorrência de <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i> e <i>Tannerella forsythia</i> , antes e após o preparo químico-mecânico.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> específicos para cada microrganismo avaliado	17
Tabela 2: Resultados estatísticos pelo teste de McNemar para a provável associação ($p < 0,05$) entre as bactérias <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> e <i>Treponema denticola</i> , antes (S1) e após (S2) o preparo químico-mecânica	24
Tabela 3: Incidência das bactérias <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> e <i>Treponema denticola</i> em 24 amostras de canais infectados, antes (S1) e após (S2) o preparo químico-mecânico	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bp: Número de pares de bases

CHX: Clorexidina

et al: (latim) Abreviatura de *et alii* (e outros)

LPS: Lipopolissacarídeos

PCR: Reação de Polimerase em Cadeia

PQM : Preparo químico-mecânico

P. gingivalis: Bactéria *Porphyromonas gingivalis*

rpm: Rotações por minuto

RTF: Reduced Transport Fluid (meio de transporte)

spp: Espécie

TBE: Tris/Borato/EDTA (solução tampão contendo mistura de base
(Trisácido Bórico e EDTA)

T. denticola: Bactéria *Treponema denticola*

T. forsythia: Bactéria *Tannerella forsythia*

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a presença de microrganismos do complexo vermelho tais como: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, em dentes com infecções endodônticas primárias antes, após o preparo químico-mecânico (PQM) com auxílio de clorexidina gel 2% (CHX, Endogel). Foram utilizadas amostras de canais radiculares com infecção endodôntica primária, antes (S1) e após PQM (S2). Os microrganismos *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* foram identificados pelo método de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e a leitura realizada em gel de agarose 1,5%. O complexo vermelho foi detectado em 4% das infecções endodônticas primárias antes do PQM e em nenhum caso após PQM. Em S1 as espécies *P. gingivalis* foram encontradas em 10 casos, *T. denticola* em 8 casos e *T. forsythia* em 4 casos. Em S2 apenas *P. gingivalis* e *T. denticola* estavam presentes. Foi também observado que bactérias totais estavam presentes em todas as amostras, inclusive naquelas que se mostraram negativas para a presença de algum dos microrganismos avaliados. Concluiu-se que as bactérias do complexo vermelho estão presentes em canais com infecção endodôntica primária, sobrevivendo à terapia endodôntica em porcentagens distintas, tendo potencial de serem patógenos endodônticos.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias anaeróbias gram-negativas são frequentemente encontradas em infecções endodônticas e estão associadas às doenças perirradiculares (Siqueira 1997). Evidências científicas indicam que as infecções endodônticas contem uma grande diversidade microbiana e que, em consequência das interações, positivas ou negativas entre os microrganismos, somente um grupo restrito de espécies bacterianas podem predominar, a ponto de causar doenças (Gomes *et al.* 1994, Gomes 2002, Vianna 2006).

Estudos com culturas de microrganismos mostraram que muitas das espécies periodontopatogênicas não são comumente isoladas de infecções endodônticas, por isso muitas vezes os métodos moleculares auxiliam na detecção dessas (Vianna *et al.* 2005, Gomes *et al.* 2007, 2009). Estes métodos podem fornecer informações importantes para o entendimento dos microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas e assim colaborar para o desenvolvimento de técnicas ou emprego de soluções químicas auxiliares que contribuam para o combate microbiano.

O número de espécies em canais radiculares infectados pode variar de 1 a mais de 12, e o número de células bacterianas pode variar de $< 10^2$ a $> 10^8$ por canal radicular (Sundqvist & Figdor 2003).

No estudo de Jung *et al.* (2000), 38 canais radiculares foram investigados pelo método de PCR e “dot-blot hybridization” para a presença

de microrganismos. Os microrganismos encontrados com maior frequência foram *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas gingivalis*. Associações significantes foram encontradas nas combinações de *T. forsythia* / *P. gingivalis* e *P. gingivalis* / *Treponema* spp.

As espécies bacterianas *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* foram denominadas como membros do complexo vermelho por Socransky *et al.* (1998). Estas estão fortemente associadas com a severidade de doenças periodontais, ou seja, estão positivamente relacionadas à presença de bolsa periodontal e de sangramento à sondagem (Socransky *et al.* 1998). Esses microrganismos parecem possuir importantes fatores de virulência que favorecem a destruição tecidual, como por exemplo, a presença de lipopolissacarídeos (LPS), produção de fibrina, proteases fosfolipase, alcalose e fosfatases (Roças *et al.* 2001). Tais espécies foram previamente encontradas em canais radiculares infectados (Siqueira 1997, Baumgartner *et al.* 1999, Sundqvist *et al.* 1989, Vianna *et al.* 2005, Gomes *et al.* 2007). Entretanto não existiam estudos que demonstrassem a prevalência, redução ou inexistência do complexo vermelho em infecções endodônticas primárias após a realização do preparo químico-mecânico.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi identificar as espécies *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* em canais radiculares infectados antes e após o preparo químico-mecânico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Complexo vermelho

2.1.2. Complexo vermelho na cavidade oral

O complexo vermelho foi descrito primeiramente por Socransky *et al.* (1982), esses autores identificaram por métodos moleculares *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* presentes em bolsas periodontais.

A relação etiológica das bactérias com as diferentes doenças periodontais baseia-se nos seguintes critérios, de acordo com Socransky *et al.* (1982):

- Para que um microrganismo seja importante em um processo de doença, deve ser comumente encontrado em números elevados nos sítios de doença e ausente ou não frequentemente encontrados nos sítios saudáveis.
- A eliminação ou supressão do organismo pelo tratamento deve ter uma influência positiva.
- Deve provocar uma resposta imunológica para o organismo, seja uma resposta de anticorpos elevada ou uma resposta celular.
- A implantação experimental de um organismo no sulco gengival de um animal deve levar ao desenvolvimento de, no mínimo, algumas

características da doença com ocorrência natural (como inflamação, destruição de tecido conjuntivo e perda óssea).

- O patógeno em questão deve possuir um potencial patogênico ou virulento.

Seguindo esses parâmetros, cinco complexos microbianos foram classificados (Socransky *et al.* 1998). As principais bactérias relacionadas com a doença periodontal do adulto são as presentes em dois desses complexos, o Complexo Vermelho (*P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticula*) e o Complexo Laranja (*P.intermedia*, *T.denticula* e *T. forsythus*). Sendo o Complexo Vermelho de maior importância na destruição periodontal, a participação desses microrganismos nas infecções endodônticas pode talvez representar uma relação com a destruição periodontal tecidual.

2.1.3. Bactérias do complexo vermelho na endodontia

As espécies de *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* são de difícil identificação por métodos de cultura em placas e foram encontradas em canais radiculares por métodos moleculares, sendo estes de extrema importância no reconhecimento das espécies envolvidas nas Infecções endodônticas.

As espécies do complexo vermelho foram detectadas em canais radiculares com infecções endodônticas (Rôças *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2007), entretanto ainda pouco se conhece sobre sua resistência aos procedimentos endodônticos.

As espécies de *Treponema denticola* foram encontradas freqüentemente e em quantidades representativas nos canais radiculares de dentes com infecções endodônticas primárias (Vianna *et al.* 2007) sugerindo que esses microrganismos podem desempenhar um papel importante nas infecções endodônticas.

Foschi *et al.* (2005) avaliaram através de métodos de cultura e também moleculares a presença de *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* em canais radiculares infectados. Foram utilizados 62 dentes e dentre esses 70% com infecções primárias. *T. denticola* e *E. faecalis* foram detectados em 24% dos casos, *P. gingivalis* em 13%, *P. intermédia* em 8% e *T. forsythia* em 7%. Os autores sugeriram que essas espécies possuiriam um papel importante nas patologias endodônticas.

As espécies de *Porphyromonas gingivalis* são encontradas na porção apical e muitas vezes podem estar relacionadas com casos de doença endodôntica de causa endo-periodontal (Carranza & Newman 1996). Entretanto, esses microrganismos mostram-se presentes em infecções endodônticas mesmo sem envolvimento periodontal, e muitas vezes estão associados aos casos de sintomatologia relacionada à etiologia endodôntica (Haapasalo 1993, Gomes *et al.* 2007).

As espécies de *Tannerella forsythia*, anteriormente conhecida como *Bacteroides forsythus*, também foram previamente encontradas dentro do canal pulpar infectado (Siqueira 1997, Baumgartner *et al.* 1999, Sundqvist *et al.* 1989, Vianna *et al.* 2005, Gomes *et al.* 2007).

3. MATERIAL E MÉTODO

Este projeto é parte integrante do projeto de Pós-doutorado intitulado: *“Variações das espécies microbianas aos procedimentos endodônticos - estudo da presença e distribuição microbiana em dentes com necrose pulpar”* desenvolvido pela aluna de pós-doutorado Morgana Eli Vianna, sob supervisão da Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

As amostras utilizadas neste projeto foram coletadas de 24 pacientes, os quais foram atendidos na Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela aluna de pós-doutorado (Comitê de ética 018/2007). A idade dos pacientes variou entre 18 e 59 anos e os pacientes não apresentavam sinais e sintomas de origem endodôntica, ou seja, eram casos assintomáticos. Os dentes selecionados eram unirradiculares, apresentando tecido pulpar necrótico com evidência radiográfica de periodontite apical.

Detalhes das coletas e procedimentos clínicos podem ser vistos em Vianna *et al.* (2007). Sumariamente, para a coleta das amostras, foi introduzido um cone de papel absorvente autoclavado no comprimento total do canal (determinado pela radiografia pré-operatória), permanecendo nesta posição por 60 segundos, antes e após PQM. Nos casos onde o canal encontrava-se seco, este foi umedecido com soro fisiológico, para assegurar uma amostra viável. Os cones de papéis foram colocados em “eppendorfs” de

1,5 ml contendo meio de transporte RTF (Reduced Transport Fluid, Syed & Loesche 1972) e congelados a -70°C para posterior processamento.

3.1. EXTRAÇÃO DO DNA

Quinhentos microlitros de cada amostra foram utilizados para extração dos DNAs, realizada com o auxílio do Qiaamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo descrito a seguir:

Inicialmente as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 180µl de ATL e 20µl de proteinase K, a seguir foram incubadas a 56°C por 30 minutos. Após, foram adicionados 200µl AL e novamente incubadas a 70°C por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 200µl de etanol 100% e todo volume foi transferido para tubos com filtro (QL Amp Mini Spin Collum). Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 1 minuto, este filtro foi transferido para outro tubo vazio do kit, 500µl de AW1 foi adicionado e novamente centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. O mesmo processo foi realizado para a adição de 500µl de AW2, seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. Os filtros foram transferidos para eppendorfs de 1,5 ml com tampa, 100µl de solução AE foi adicionada; aguardou-se 3 minutos para nova centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. Essa solução obtida continha o DNA das amostras e foi conservada em freezer a 20°C para posterior processamento.

A concentração do DNA foi mensurada a A_{260} utilizando Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

3.2. REAÇÕES DE PCR

Após a extração do DNA, a reação de PCR foi realizada em um termociclador convencional (Biometra, Gottingen, Alemanha).

Os primers específicos foram utilizados para verificar a presença de microrganismos do complexo vermelho. Os primers e a provável amplificação para a espécie bacteriana testada (número de bases pares – bp) estão citados na Tabela 1.

Tabela 1. Primers específicos para cada microrganismo avaliado.

Microrganismos	Primers	Posição das bases(bp)	Autores
Bactérias totais (EuF/ EuR)	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	120-760 (466)	Nadkarni <i>et al.</i> 2002
<i>T. denticola</i> (TdF/ TdR)	TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA	729-1132 (404)	Ashimoto <i>et al.</i> 1996
<i>P. gingivalis</i> (PgF/ PgR)	AGGCAGCTTGCCATACTGCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT	193-508 (316)	Ashimoto <i>et al.</i> 1996
<i>T. forsythia</i> (TfF/ TfR)	GCGTATGTAACCTGCCCCGCA TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	786-1387 (602)	Ashimoto <i>et al.</i> 1996

T. denticola: *Treponema denticola*, *P. gingivalis*: *Porphyromonas gingivalis*, *T. forsythia*: *Tannerella forsythia*

Os DNAs das bactérias seguintes foram utilizados como controle de PCR: *Tannerella forsythia* (antiga nomenclatura: *Bacteroides forsythus*) ATCC 43037, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e *Treponema denticola* ATCC 35405 gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia Oral da Universidade de Aachen (RWTH – Aachen, Alemanha).

Treponema denticola

As reações foram realizadas com volume final de 25 µl, na qual continha 1,5 µl do DNA extraído, 0,25 µl TdF primer (100µM), 0,25 µl TdR primer (100µM), 0,5 µl dNTP's, 2,5 µl de tampão (10X Taq buffer), 1,25 µl MgCl₂, 0,125 µl de Taq Polymerase (5 U/µL), 18,6 µl água Mili-Q. O protocolo das temperaturas foi: 95°C por 2 min; 36 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e elongação final de 72°C por 10 minutos.

Porphyromonas gingivalis

O volume final de cada reação foi de 25 µl, na qual continha 1,5 µl do DNA extraído, 0,25 µl PgF primer (100µM), 0,25 µl PgR primer (100µM), 0,5 µl dNTP's, 2,5 µl de tampão (10X Taq buffer), 1,25 µl MgCl₂, 0,125 µl de Taq Polymerase (5 U/µL), 18,6 µl água Mili-Q. O protocolo das temperaturas foi: 95°C por 2 min; 36 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e elongação final de 72°C por 10 minutos.

Tannerella forsythia

O volume final de cada reação foi de 25µl na qual continha 1,5 µl do DNA extraído, 1,0 µl TfF primer (100µM), 1,0µl TfR primer (100µM), 0,5 µl dNTP's, 5,0 µl de tampão (10X Taq buffer), 1,25µl MgCl₂, 0,5µl de Taq Polymerase (5 U/µL), 18,25 µl água Mili-Q. O protocolo das temperaturas foi: 95°C por 2 min; 36 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e elongação final 72°C por 10 minutos.

Bactérias totais

Uma amplificação com primers universais foi realizada para verificação da presença de DNA bacteriano nas amostras (bactérias totais).

As seqüências dos primers universais (Tabela 1) foram as mesmas descritas por Nadikarni *et al.* (2002), previamente testadas sua universalidade por Horz *et al.* (2005). O resultado encontrado foi positivo para a presença de DNA bacteriano em todas as amostras, inclusive naquelas que se mostraram negativas para a presença de algum dos microrganismos avaliados.

Para as reações com primers universais (Tabela1) foram realizadas reações com volume total de 25 µl, na qual continha 1,5 µl do DNA extraído, 0,25 µl EuF primer (100µM), 0,25 µl EuR primer (100µM), 0,5 µl dNTP's, 2,5 µl de tampão (10X Taq buffer), 1,25 µl MgCl₂, 0,125 µl de Taq Polymerase (5 U/µL), 18,6 µl água Mili-Q. O protocolo das temperaturas foi: 95°C por 2 min; 36 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e elongação final de 72°C por 10 minutos.

3.3. ELETROFORESE

As bandas dos microrganismos do complexo vermelho foram evidenciadas com a coloração de 6 X loading Dye Solution (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). Inicialmente foram coradas com SYBR Gold (Invitrogen, Calrsbad, CA, USA), no entanto por esta substância ser muito sensível e ausência de um filtro para realizar as capturas das imagens, as bandas não puderam ser diferenciadas. Sendo assim a coloração foi substituída por brometo de etídio, que foi adicionado ao gel.

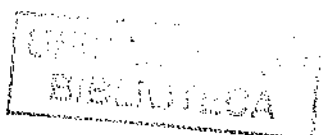
Foram utilizados os equipamentos laboratoriais, Fonte de eletroforese (PWSys – PW300, Biosystems, Brasil) e Cuba de eletroforese (Omniphor). Além de Fonte de luz (Transiluminador) para fotodocumentação de gel de agarose (ECX-20.M / z654469, Vilber Lourmat, France).

Protocolo para o gel de agarose

Misturar 100ml de solução de TBE a 1% com 1,0g de ágar e aquecer até que a mistura torne-se transparente. Acrescentar 3,0 µl de brometo de etídio e despejar o conteúdo na placa acrílica própria do equipamento, esperar que geleifique. Introduzir a placa com o gel na cuba de eletroforese e cobrir com solução de TBE 1%.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliadas as possíveis associações entre espécies e redução microbiana após os procedimentos endodônticos através do teste de McNemar ($p < 0,05$).



4. RESULTADOS

Foram extraídos os DNAs de todas as amostras, antes e após o preparo químico-mecânico. Os protocolos das reações de PCR foram estabelecidos com os DNAs dos controles positivos: *Tannerella forsythia* (ATCC 43037), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Treponema denticola* (ATCC 35405). Os controles negativos não apresentaram bandas em todas as reações, mostrando que as reações não sofreram interferência de falsos positivos.

A Figura 1 mostra os comprimentos de bandas das amostras positivas das bactérias do complexo vermelho: *Porphyromonas gingivalis* - 404 bp, *Tannerella forsythia*: 641 bp e *Treponema denticola*: 316 bp.

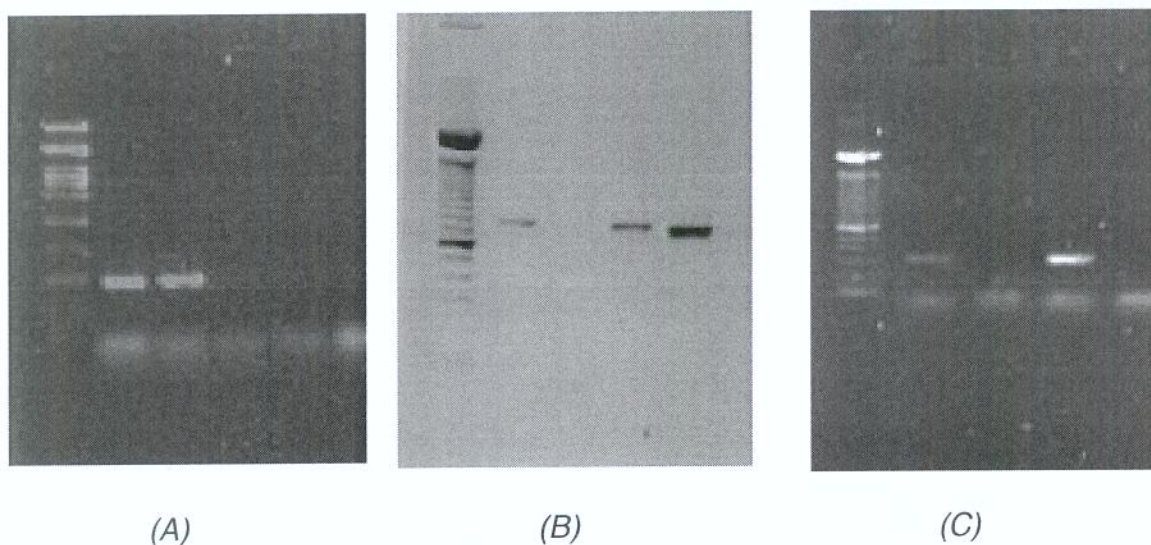


Figura 1. Eletroforese das bandas geradas pela amplificação por PCR, com os primers específicos para as bactérias: A) *Porphyromonas gingivalis* (404 bp), B) *Tannerella forsythia* (641 bp) e C) *Treponema denticola* (316 bp), respectivamente.

A Figura 2 mostra a freqüência de microrganismos do complexo vermelho nas amostras iniciais (dados em porcentagem). As três bactérias foram encontradas concomitantemente em 4% dos casos (n=1). Associações entre duas das espécies investigadas ocorreram-se em 29% (n=7) dos casos. A presença de 1 espécie apenas foi encontrada em 29% dos casos. Em 38% (n=9) das amostras não ocorreram nenhuma das bactérias investigadas.

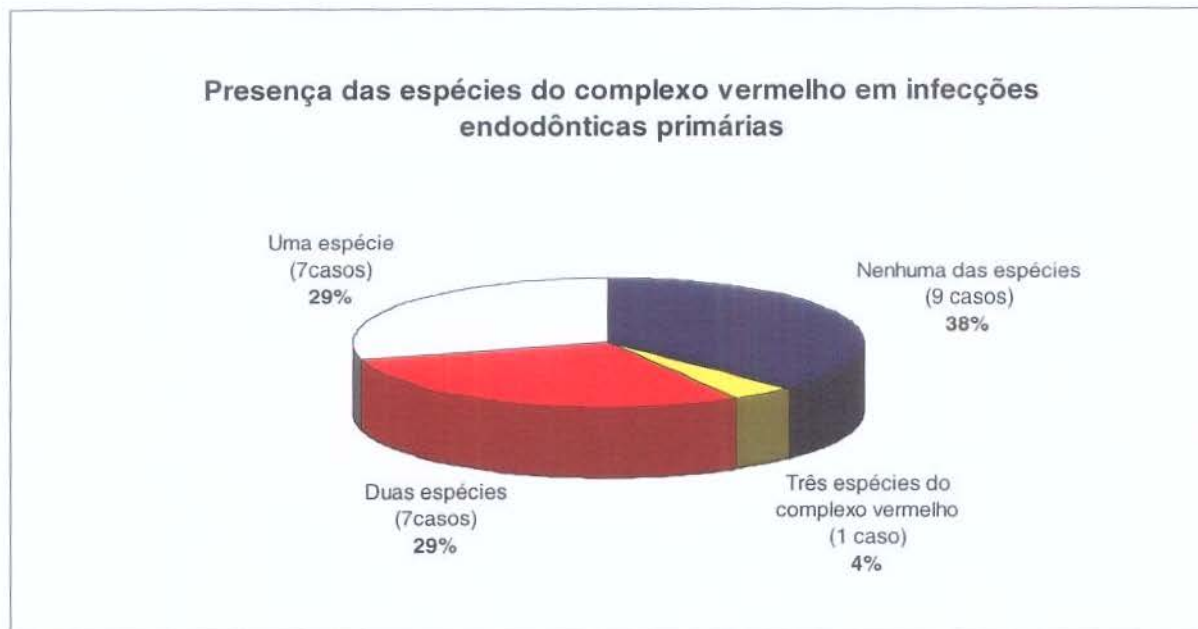


Figura 2. Porcentagem encontrada das espécies que compõem o complexo vermelho, quando em associação das 3 espécies e quando dissociadas, em 24 casos de infecções endodônticas primárias.

A Figura 3 mostra a ocorrência das três bactérias antes e após o preparo químico-mecânico. O complexo vermelho com a presença das 3 bactérias não foi encontrado após o preparo químico mecânico. Houve redução de todas as espécies avaliadas, entretanto a espécie *Treponema denticola* foi a que apresentou menor redução em relação às amostras iniciais (S1).

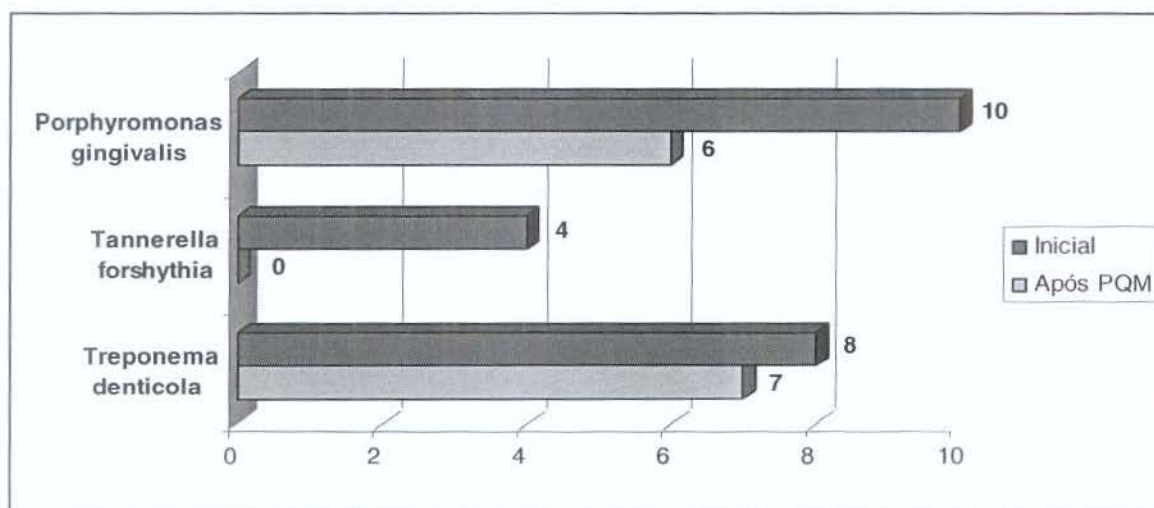


Figura 3. Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, antes e após o preparo químico-mecânico.

A Tabela 2 mostra os resultados estatísticos pelo teste de McNemar para a provável associação ($p < 0,05$) entre as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, antes (S1) e após (S2) o preparo químico-mecânico. Nenhuma associação estatisticamente positiva foi encontrada entre os microrganismos.

Tabela 2. Resultados estatísticos pelo teste de McNemar para a provável associação ($p < 0,05$) entre as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, antes (S1) e após (S2) o preparo químico-mecânico.

	<i>P. gingivalis</i> (S1)	<i>T. forsythia</i> (S1)	<i>T. denticola</i> (S1)	<i>P. gingivalis</i> (S2)	<i>T. forsythia</i> (S2)	<i>T.denticola</i> (S2)
<i>P. gingivalis</i> (S1)		0,0578	0,4795	0,1573		
<i>T. forsythia</i> (S1)	0,0578		0,1573			
<i>T. denticola</i> (S1)	0,4795	0,1573				0,3173
<i>P. gingivalis</i> (S2)	0,1573					0,7055
<i>T. forsythia</i> (S2)						
<i>T. denticola</i> (S2)			0,3173	0,7055		

* valores de "p" pelo teste de McNemar - SAS 9.1

A Tabela 3 mostra a presença ou ausência, em cada amostra (numeradas de 1 a 24) dos microrganismos estudados, ou seja: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. *Treponema denticola* esteve presente em 8 amostras iniciais e em 7 após o PQM. *Porphyromonas gingivalis* esteve presente em 10 amostras iniciais e em 6 após o PQM. *Tannerella forsythia* esteve presente em 4 amostras iniciais e ausentes após o PQM. A presença do complexo vermelho, em conjunto, foi verificada em 1 amostra antes do preparo e em nenhuma após o PQM.

Tabela 3. Incidência das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* em 24 amostras de canais infectados, antes (S1) e após (S2) o preparo químico-mecânico.

Amostras numeradas	<i>P. gingivalis</i>		<i>T. forsythia</i>		<i>T. denticola</i>	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2
1.	0	0	0	0	0	0
2.	0	0	0	0	0	0
3.	0	0	0	0	0	0
4.	1	1	0	0	1	1
5.	0	1	0	0	1	1
6.	1	0	0	0	0	0
7.	0	0	0	0	0	0
8.	1	0	1	0	1	1
9.	0	0	0	0	0	0
10.	0	0	1	0	0	0
11.	0	0	0	0	0	0
12.	0	0	1	0	1	1
13.	0	0	0	0	0	0
14.	0	1	0	0	0	0
15.	1	0	0	0	0	0
16.	1	0	0	0	0	0
17.	0	0	0	0	0	0
18.	1	0	0	0	1	1
19.	1	0	1	0	0	0
20.	1	1	0	0	0	0
21.	0	0	0	0	0	0
22.	1	1	0	0	1	1
23.	0	0	0	0	1	1
24.	1	1	0	0	1	0

5. DISCUSSÃO

Métodos de cultura são eficazes na identificação de diversas espécies microbianas. No entanto podem se mostrar insuficientes para a identificação de determinadas espécies de difícil cultivo, principalmente as anaeróbias restritas.

A gama de espécies presentes na microbiota típica dos canais infectados tem aumentado desde que se introduziram métodos moleculares de identificação. Por exemplo, através do PCR espiroquetas foram detectadas nos canais radiculares (Roças *et al.* 2003, Gomes *et al.* 2007).

Vianna *et al.* (2005) avaliaram a microbiota de dentes com infecção pulpar utilizando o método de cultura e o método molecular microarray (DNA chip). *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, dentre outros, estavam entre os microrganismos mais frequentemente encontrados por DNA chip, entretanto *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* não puderam ser encontrados pelo método de cultura.

O método de PCR possui vantagens e desvantagens. Sua sensibilidade é extremamente grande, podendo levar a resultados errôneos ao identificar pequenas contaminações, acusando falso-positivos. O protocolo para sua realização deve ser rigorosamente seguido, evitando-se a exposição das amostras (Siqueira & Roças 2005).

O método molecular de PCR foi o escolhido no presente estudo e controles negativos foram utilizados em todos os testes. Todos mostraram resultados negativos, indicando que não ocorreu contaminação durante a

manipulação das amostras, eliminando possibilidades de falso-positivos.

Foi realizado o teste para detecção de bactérias totais utilizando primers universais. O resultado encontrado foi positivo para a presença de DNA bacteriano em todas as amostras, inclusive naquelas que se mostraram negativas para a presença de algum dos microrganismos avaliados.

Foi utilizado como substância química auxiliar a clorexidina gel a 2%. A escolha da clorexidina como substância auxiliar em tratamentos endodônticos é relativamente recente se comparada à utilização do hipoclorito de sódio, tendo mostrado excelentes resultados.

Algumas das características importantes da clorexidina são: ação antimicrobiana imediata e de amplo espectro, sua biocompatibilidade e relativa ausência de toxicidade, capacidade de adsorção pela dentina e lenta liberação da substância ativa (prolongando sua atividade antimicrobiana residual).

Socransky *et al.* (1998) avaliando microbiologicamente o biofilme dental presente na placa subgengival sugeriram a prevalência de determinadas espécies bacterianas e uma inter-relação entre algumas delas. As principais associações bacterianas foram classificadas em 5 complexos distintos: Vermelho, Laranja, Amarelo, Verde e Roxo.

Tannerella forsythia é um bacilo gram-negativo, anaeróbio estrito. Faz parte do grupo dos patógenos periodontais e é encontrada em bolsas periodontais profundas. Gomes *et al.* (2007) encontraram associações estatísticas significantes entre *T. forsythia* e dor a percussão, mobilidade dental, exsudato purulento e presença de abscesso. No presente estudo *T.*

forsythia foi identificada em 4 canais nas amostras iniciais, e esteve ausente em todas as amostras após PQM.

Treponema denticola é uma espiroqueta oral Gram-negativa, anaeróbica estrita, que apresenta motilidade e é altamente proteolítica. Está associada com doenças periodontais severas e lesões perirradiculares. Associações estatísticas significantes foram descritas por Gomes *et al.* (2006), entre essa bactéria e a presença de abscesso, exsudato purulento e mobilidade dental. No presente estudo foi encontrada em 8 casos antes do PQM e em 7 após PQM.

P. gingivalis é um bacilo gram-negativo, aneróbio estrito. É integrante de um grupo de bactérias denominadas de produtoras de pigmento negro (BPPN). Associações importantes foram encontradas entre as combinações de *P. gingivalis* / *T. forsythia* e *P. gingivalis* / *Treponema* spp (Jung *et al.* 2000). Neste trabalho foi identificada em 10 casos antes e em 6 após PQM. Não foi relatada significância estatística de associações entre as espécies, no entanto um valor muito próximo pode ser visto entre a associação de *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* (teste de McNemar, $p < 0,05$).

Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com a literatura pesquisada (Jung *et al.* 2000, Roças *et al.* 2001, Vianna *et al.* 2005, Gomes *et al.* 2007). No entanto, deve-se levar em consideração o pequeno número de amostras (24), o que limitou análises estatísticas mais complexas tais como a suscetibilidade bacteriana aos procedimentos endodônticos e as associações entre os microrganismos avaliados. A ocorrência ao mesmo tempo das espécies do complexo vermelho investigadas ocorreu em apenas

um caso.

6. CONCLUSÃO

Frente aos resultados encontrados, concluiu-se que as bactérias do complexo vermelho estão presentes em canais com infecção endodôntica primária, sobrevivendo à terapia endodôntica em porcentagens distintas, tendo potencial de serem patógenos endodôntico. Trabalhos futuros envolvendo a utilização de medicação intracanal para verificar a suscetibilidade destes microrganismos a esta etapa da terapia endodôntica podem-se mostrar importantes.

REFERÊNCIAS

1. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 266-73.
2. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999; 25: 413-15.
3. Carranza FA, Newman MG. *Periodontia clínica.* 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.
4. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbial Immunol.* 2005; 20: 289-95.
5. Gomes BPFA. *Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico [tese].* Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2002.
6. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios.* 1994; 80: 231-43.
7. Gomes BPFA, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JF *et al.* Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009; 37: 76-81.
8. Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2007; 33: 1049-52.
9. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Souza ELR, Zaia AA, Ferraz CCR *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections an failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32(10): 937-40.

10. Haapasalo M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1993; 6: 213-7.
11. Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Contrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5332-7.
12. Jung IY, Choi BK, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000; 26: 599-604.
13. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol.* 2002; 148: 257-66.
14. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN, Coelho AM. "Red Complex" (*Bacteróides 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.
15. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J.* 2003; 36: 20-6.
16. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Occurrence of two newly named oral treponemes - *Treponema parvum* and *Treponema putidum* – in primary endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 372-5.
17. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3314-9.
18. Siqueira JF Jr. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997. p.31-2.
19. Socransky SS, Tanner ACR, Haffajee AD, Hillman JD, Goodson JM. Present status of studies on the microbial etiology of periodontal diseases. In: Genco RJ, Mergenhagen SE, editors. Host-parasite interactions in

- periodontal diseases. Washington: American Society for Microbiology; 1982. p. 1-12
20. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial Complex in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25: 134-44.
21. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J Endod. 1989; 15: 13-9.
22. Sundqvist G, Figdor D. life as endodontopathogen. Endod Topics. 2003; 6: 3-28.
23. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol. 1972; 24: 638-44.
24. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 411-8.
25. Vianna ME. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas [tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2006.
26. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 253-8.





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



CERTIFICADO-2ª VIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Variações das espécies microbianas aos procedimentos endodônticos - estudo da presença e distribuição microbiana em dentes com necrose pulpar", protocolo nº 018/2007, dos pesquisadores **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, ANA CLARA FAGUNDES PEDRONI e MORGANA ELI VIANNA**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 08/05/2007.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Variation of microbial species to endodontic procedures - a study of microorganisms' prevalence and distribution in tooth with pulp necrotic tissue", register number 018/2007, of **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, ANA CLARA FAGUNDES PEDRONI and MORGANA ELI VIANNA**, 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 08/05/2007.

Cynthia Pereira Machado Tabchoury
Profa. Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP

Jacks Jorge Júnior
Prof. Jacks Jorge Júnior

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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Piracicaba, 18 de setembro de 2007

CERTIFICADO

Certificamos que **Ana Clara Fagundes Pedroni** participou do Curso Teórico: **MÉTODOS QUÍMICOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS ENDODONTICAS** ministrado pela Profa. Dra. Morgana Eli Vianna, com carga horária de 08 horas, realizado no dia 17 de outubro de 2007.

Atenciosamente,

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Morgana", written over a horizontal line.

Profa. Dra. Morgana Eli Vianna

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Av. Limeira, 901- Caixa Postal 52
CEP 13414-900 - Piracicaba - SP - Brasil