



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



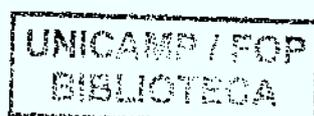
# **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Bruna Cristina Sanches Piovesana

Orientador(a): Brenda Paula Figueiredo A. Gomes

Ano de Conclusão do Curso: 2009



14932



1290004999

TCC/UNICAMP  
P659i  
FOP

Bruna Cristina Sanches Piovesana

# Identificação de espécies de *Treponema* de dentes com infecções endodônticas primárias.

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, para a obtenção do Diploma de Cirurgião Dentista.

Profa. Dra. Brenda de Paula Figueiredo A. Figueiredo

Orientadora

Piracicaba 2009

Unidade - FOP/UNICAMP  
TCC / UNICAMP  
P.659i Ed.....  
Vol..... Ex.....  
Tombo 4999  
C  D   
Proc. 16p. 134/10  
Preço R\$ 11,00  
Data 13/08/10  
Registro 772681

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

P659i Piovesana, Bruna Cristina Sanches.  
Identificação de espécies de Treponema de dentes com  
infecções endodônticas primárias. / Bruna Cristina Sanches  
Piovesana. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.  
27f. : il.

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

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

(mg/fop)

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô Romualdo Piovesana, que sempre rezou por mim para que eu me formasse e seguisse sempre o melhor caminho.

Também dedico à minha orientadora de iniciação científica Profa. Dra. Morgana Eli Vianna, por sua constante disposição em colaborar, dedicação, paciência e amizade sem as quais seria impossível concluir este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui e por sempre olhar por nós.

Aos meus pais pela entrega total a mim durante esses quatro anos, pela confiança em mim depositada e pelo apoio sempre dado, para que eu continuasse da melhor forma possível.

Aos meus avós Yolanda, Romualdo (em memória), Maura e Antonio pelos terços e missas rezadas, e aos tios que sempre torceram por mim e me ajudaram em tudo que precisei, desde o início.

À professora Brenda Gomes, minha orientadora do TCC, por ter cedido o laboratório e por ter contribuído com seu conhecimento e atenção para conclusão desse trabalho.

Às pessoas do laboratório de Endodontia (em especial Geovania Almeida, Francisco Montagner, Vanessa Berber e Fernanda Signoretti), onde trabalhei durante um ano e meio, e que puderam tornar realidade este trabalho, sempre contribuindo sendo com conhecimentos ou com companhias agradáveis.

Não posso deixar de agradecer a meus amigos que desde o início estiveram comigo, tanto nas alegrias quanto nas dificuldades, tanto me apoiando quanto recriminando, quando necessário, e que também sem eles essa caminhada seria muito mais penosa, escura e sem graça de se seguir.

Agradeço também às famílias Klain e Cristofolletti pelo constante apoio, incentivo e acolhimento a mim dados.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

## SUMÁRIO

### Página

1. RESUMO.....	5
2. INTRODUÇÃO.....	6
3. OBJETIVO.....	8
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ESPÉCIES DE TREPONEMA ...	9
4.2 AS ESPIROQUETAS NA CAVIDADE ORAL.....	10
4.3 FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS AS ESPIROQUETAS.	11
5. MATERIAL E MÉTODO.....	13
5.1. ISOLAMENTO DO DNA.....	13
5.2. REAÇÕES DE PCR.....	14
5.2.1.PRIMEIRA REAÇÃO.....	15
5.2.2. SEGUNDA REAÇÃO.....	15
5.3. ELETROFORESE.....	18
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
6. RESULTADOS.....	20
7. DISCUSSÃO.....	24
8. CONCLUSÃO.....	26
9. REFERÊNCIAS.....	26

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Página

<b>Tabela 1</b> <i>Primers</i> específicos para cada microrganismo avaliado.....	<b>17</b>
<b>Tabela 2</b> Frequência das espécies de <i>treponema</i> encontradas em 35 canais.....	<b>21</b>
<b>Gráfico 1</b> Prevalência das espécies de <i>Treponema</i> encontradas em 35 canais radiculares com necrose pulpar.....	<b>22</b>

## LISTA DE NOTAÇÕES

+ *Treponema* presente

- *Treponema* ausente

## 1. RESUMO

**Objetivo:** o objetivo deste estudo foi avaliar a presença e distribuição de espécies de treponema em canais radiculares com necrose pulpar.

**Método:** Cinquenta amostras foram coletadas dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença lesões perirradiculares, destas 35 apresentaram resultados positivos para presença de microrganismos. Estas 35 amostras clínicas foram estudadas com relação a prevalencia de sete espécies de treponema pelo método de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

**Resultados:** As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Treponema denticola* e *Treponema socranskii*, ambas com 37%, seguidas de *T. vicentii* (14%), *T. medium* (8%), *T. maltophilum* (2,85%). As espécies *T. pectinovorum* e *T. amylovorum* não foram encontradas nas amostras avaliadas.

**Conclusão:** Os resultados das reações de PCR mostram que cinco das especies de *Treponema* estudadas fazem parte da microbiota associada às infecções endodônticas primárias.

## 2. INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos são os principais causadores e mantenedores das doenças pulpares e perirradiculares (Allison et al. 1990). Esses agentes etiológicos podem pertencer a um dos três domínios de vida: bactéria, archaea e eucária, como por exemplo, os fungos (Vianna et al. 2005, 2006). Dentre estes, as bactérias estão comprovadamente relacionadas à etiologia destas doenças (Siqueira et al. 2005).

As espécies de treponema são bactérias Gram-negativas do filo *Spirochaetes*. Estas possuem forma filamentosa longa, espirilada que tendem a se mover com movimentos ondulantes semelhantes ao de uma hélice. Muitas espécies de espiroquetas são agentes patogênicos nocivos ao homem, causando, por exemplo, a sífilis e erupções cutâneas contagiosas (Pétasse tropica) comuns nas regiões de clima tropical (Centurion-Lara et al. 2006).

As espécies de treponema também estão associadas a infecções orais, como por exemplo, a doenças periodontais (Loesche 1988) e periodontites apicais (Siqueira & Roças 2003a,b). Entretanto a detecção, isolamento e identificação de espécies individuais mostra-se limitada pelas técnicas de cultura. Até mesmo a identificação dessas espécies por métodos mais sofisticados também parece ser limitada, como por exemplo, o uso de anticorpos ou de sondas de DNA (Willis et al. 1999). Pelo método de PCR as espécies de treponema foram identificadas em canais radiculares (Siqueira et al. 2003, Siqueira & Roças 2003, Vianna et al. 2008). Por PCR em tempo real (real time-PCR), as espécies do gênero *Treponema* mostraram ser freqüentemente identificadas 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.

As espécies de *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram identificadas em dentes com infecções endodônticas primárias (Siqueira et al. 2003, Vianna et al. 2008), passíveis de serem encontradas mesmo após o preparo químico-mecânico (Vianna et al. 2008). *Treponema amylovorum*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium* também foram identificadas por “nested” PCR em dentes com infecções endodônticas primárias (Siqueira & Roças 2003), sendo considerados potenciais endodonto patógenos. Algumas espécies de *Treponema*, como por exemplo, *Treponema amylovorum* (Wyss et al. 1997) e *Treponema medium* (Umemoto et al. 1997) estão relacionadas à severidade da doença periodontal. Entretanto, faz-se necessária uma avaliação da diversidade de espécies de treponema nas infecções endodônticas primárias para um maior entendimento destas espécies nas infecções endodônticas primárias.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi explorar a diversidade de espécies de treponema por métodos moleculares (Reação de polimerase em Cadeia - PCR) em amostras de canais radiculares infectados contendo tecido pulpar necrótico e presença de periodontite apical.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ESPÉCIES DE TREPONEMA

As treponemas são bactérias Gram-negativas do filo *Spirochaetes* de forma filamentosa longa, espirilada que tendem a se mover com movimentos ondulantes semelhante ao de uma hélice (Centurion-Lara et al. 2006). Essas espiroquetas anaeróbias têm um significativo metabolismo de oxigênio, até mesmo em baixos níveis de oxigênio medidos em bolsas periodontais e contém enzimas que oferecem proteção contra os prejuízos das espécies reativas ao oxigênio (Caldwell e Marquis 1999).

As espiroquetas têm forma helicoidal, mas diferem estruturalmente de outras bactérias helicoidais (Chan & McLaughlin 1999). Muitas delas são patogênicas, ou seja, nocivas ao homem, causando, por exemplo, a sífilis e erupções cutâneas contagiosas comuns nas regiões de clima tropical (Centurion-Lara et al. 2006).

As espécies de treponemas podem estar associadas a infecções orais, como doenças periodontais (Loesche 1988) e periodontites apicais (Siqueira & Roças 2003a,b). Entretanto, detecção destas espécies nas infecções mostra-se limitada pelas técnicas de cultura, pois estas espécies possuem metabolismo e requerem condições especiais para mimetização do ambiente Ecológico in vivo, sendo assim o método de cultura dificilmente possibilita o isolamento e identificação dessas espécies (Vianna et al. 2005).

Essas formamas microbianas foram freqüentemente identificadas 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.

#### 4.2 AS ESPIROQUETAS NA CAVIDADE ORAL

As espiroquetas são altamente detectadas em biofilmes subgengivais associadas à doença periodontal e regularmente representam a maioria da composição da microbiota (Caldwell e Marquis 1999).

Todas as espiroquetas orais são classificadas no gênero *treponema* e estas podem representar mais de 50% da microbiota detectável no biofilme subgengival de pacientes com gengivite úlcero-necrosante aguda e periodontite crônica, considerando que elas compreendem a menos de 1% em sítios saudáveis (Chan & McLaughlin 2000).

Apesar das espécies de *treponemas* serem exemplos de bactérias de difícil cultivo, elas têm sido amplamente identificadas em infecções endodônticas por métodos moleculares. Sakamoto et al. (2009) por métodos de cultivo e clonagem verificou que ha uma grande porcentagem e diversidade de espécies de *treponema* nos canais radiculares. Das dez espécies de *treponema* cultiváveis somente *T. pectinovorum* não foi detectada.

As espécies de *treponema* cultiváveis que predominam na comunidade de espiroquetas são *T. maltophilum*, *T. socranskii*, *T. denticola*, e *T. medium*, dentre as quais somente a última não foi encontrada em alta prevalência. Estas espécies de *treponema* dominam a comunidade de espiroquetas, contudo suas proporções em relação à microbiota total de bactérias não foi estabelecida (Sakamoto et al. 2009).

### 4.3 FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS AS ESPIROQUETAS

Os fatores de virulência das espiroquetas orais têm sido discutidos dentro dos seguintes limites: aderência, efeitos citotóxicos, seqüestro de ferro e locomoção (Chan & McLaughlin 2000)

*T. denticola* tem mostrado atacar os fibroblastos da gengiva humana, a base das membranas das proteínas, assim como outros substratos com ligações de ataque específicas. A ligação de espiroquetas a fibroblastos gengivais humanos resulta em citotoxicidade e morte celular devido a liberação de enzimas e outras proteínas. A ligação das espiroquetas aos eritrócitos é acompanhada por aglutinação e lise destes (Chan & McLaughlin 2000).

A habilidade locomotora das espiroquetas patogênicas é um dos fatores associados com sua virulência. Tal habilidade capacita espiroquetas patogênicas a migrar nos fluidos viscosos e dentro dos espaços inter e intracelular do corpo hospedeiro, ou seja, estas conseguem penetrar nos tecidos conjuntivos, como por exemplo no tecido gengival (Chan & McLaughlin 2000).

Para que estes micrororganismos possam causar doença, as espiroquetas devem ser capazes de aderir-se a um substrato, multiplicar-se e expressar seus fatores de virulência. *Treponema denticola* mostrou ser capaz de aderir-se aos fibroblastos gengivais humanos tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. Esta observação sugere que o mecanismo de ligação aos fibroblastos é mediado por lectina com afinidade para galactose e manose na superfície do fibroblasto gengival humano. A aderência das espiroquetas orais no sulco gengival não é por si só um processo patológico, este pode ser considerado apenas quando os efeitos citopatológicos da aderência e

colonização das bactérias acontecem que a colonização inicial pode ser considerada um fator virulento (Chan & McLaughlin 2000).

Especificamente na doença periodontal, espiroquetas foram encontradas entre as células dentro do epitélio juncional que são normalmente unidas fortemente, e no epitélio adjacente e conectivo bem como, na superfície do tecido do osso alveolar. A habilidade de locomoção através de ambientes viscosos pode conferir vantagens ecológicas, tais como habilidade de migrar para dentro do fluido sulcular gengival e de penetrar nos sulcos do epitélio sulcular e tecido conjuntivo gengival. Espiroquetas orais, como todos os patógenos periodontais implicaram no processo de doença periodontal graças a sua predominância numérica nos sítios inflamados afetados (Chan & McLaughlin 2000).

Nas Infecções endodônticas pouco se conhece sobre os fatores de virulência de tais microrganismos, porém devido as características similares dos tecidos, como por exemplo, tecido conjuntivo da polpa, pode-se especular que tais características dos fatores de virulência sejam aplicáveis também nos tecidos pulpares.

## **5. MATERIAL E MÉTODO**

Foram selecionados 50 pacientes que compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba e possuíam dentes indicados para o tratamento endodôntico devido à necrose pulpar. As amostras foram coletadas pela orientadora de iniciação científica (Profa. Dra. Morgana Eli Vianna), com acompanhamento da aluna de iniciação científica, na Clínica de especialização da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Detalhes das coletas e procedimentos clínicos foram realizados conforme Vianna et al. (2007). 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. Nos casos onde o canal encontrou-se seco, este foi umedecido com soro fisiológico. Os cones de papel foram colocados em tubos plásticos (eppendorfs) contendo 1 ml de meio de transporte RTF (Rich Transport Fluid, Syed & Loesche 1972) e congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento.

### **5.1. ISOLAMENTO DO DNA**

O DNA das amostras foi extraído 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 e o supernadante foi removido. Foram adicionados 180 $\mu\text{l}$  de ATL e 20 $\mu\text{l}$  de proteinase K, a seguir foram incubadas a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após isso, foram adicionados 200 $\mu\text{l}$  AL e novamente incubadas a  $70^{\circ}\text{C}$  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, esse filtro foi transferido para outro tubo vazio do kit, 500µl de AW1 foi adicionado a esse tubo 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 20°C para posterior processamento.

## 5.2. REAÇÕES DE PCR

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

As espécies de treponema foram identificadas por *nested PCR*. Os microrganismos: *T. denticola* DSMZ 14222 (type strain), *Treponema socranskii* subsp. *socranskii* ATCC 35536 (type strain), *Treponema pectinovorum* ATCC 33768 (type strain), *T. medium* ATCC 700293 (type strain), *T. vincentii* ATCC 35580 foram utilizados como controles positivos.

### 5.2.1. PRIMEIRA REAÇÃO

A primeira reação foi realizada com primers universais (tabela 1) com 2,5 µl tampão (10X Taq buffer); 18,5 µl de água Milli-Q; 0,5 µl de dNTP; 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µl de EuF primer (100 µM); 0,25 µl de EuR primer (100 µM); 0,125 µl de Taq Polymerase (5 U/µL). Posteriormente, durante a realização dos testes pilotos, o protocolo das reações foi ajustado, bem como o protocolo de temperaturas que inicialmente foi: 95°C por 2 min; 36 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e alongação final a 72°C por 4 minutos.

### 5.2.2. SEGUNDA REAÇÃO

*T. denticola*: 1,0 µl do reagente universal; 2,5 µl tampão (10X Taq buffer); 19,0 µl de água Milli-Q; 0,5 µl de dNTP; 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µl de EuF primer (100 µM); 0,25 µl de EuR primer (100 µM); 0,125 µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 60°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

*T. socranskii*: 1,0 µl do reagente universal; 2,5 µl tampão (10X Taq buffer); 19,0 µl de água Milli-Q; 0,5 µl de dNTP; 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 µl de EuF primer (100 µM); 0,25 µl de EuR primer (100 µM); 0,125 µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 53°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

***T. vicentii***: 1,0µl do reagente universal; 2,5µl tampão (10X Taq buffer); 19,0µl de água Milli-Q; 0,5µl de dNTP; 1,25µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µl de EuF primer (100µM); 0,25µl de EuR primer (100µM); 0,125µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 53°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

***T. medium***: 1,0µl do reagente universal; 2,5µl tampão (10X Taq buffer); 19,0µl de água Milli-Q; 0,5µl de dNTP; 1,25µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µl de EuF primer (100µM); 0,25µl de EuR primer (100µM); 0,125µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 54°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

***T. pectinovorum***: 1,0µl do reagente universal; 2,5µl tampão (10X Taq buffer); 19,0µl de água Milli-Q; 0,5µl de dNTP; 1,25µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µl de EuF primer (100µM); 0,25µl de EuR primer (100µM); 0,125µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 53°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

***T. maltophilum***: 1,0µl do reagente universal; 2,5µl tampão (10X Taq buffer); 19,0µl de água Milli-Q; 0,5µl de dNTP; 1,25µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µl de EuF primer (100µM); 0,25µl de EuR primer (100µM); 0,125µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2

minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 54°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

***T. amylovorum***: 1,0µl do reagente universal; 2,5µl tampão (10X Taq buffer); 19,0µl de água Milli-Q; 0,5µl de dNTP; 1,25µl de MgCl<sub>2</sub>; 0,25µl de EuF primer (100µM); 0,25µl de EuR primer (100µM); 0,125µl de Taq Polymerase (5 U/µL). A realização dos testes depois da desnaturação inicial em 95°C por 2 minutos, 36 ciclos foram realizados como a seguir: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 60 segundos a 54°C, extensão por 2 minutos a 72°C, e uma final extensão a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1.** *Primers* específicos para cada microrganismo avaliado.

<b>Microrganismos</b>	<b>Primers</b>	<b>Posição (Bases pares)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
<i>Universal 16S ribosomal DNA</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTACGACTT	8–1.513 (1.505)	55
<i>T. denticola</i>	TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA	193–508 (316)	60
<i>T. amylovorum</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTCACGCCTTTATTCCGTGAG	8–211 (193)	54
<i>T. maltophilum</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CCTATTGTGCTTATTCATCAGGC	8–446 (438)	54
<i>T. medium</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CCTTATGAAGCACTGAGTGTATTC	8–200 (192)	54
<i>T. socranskii</i>	GATCACTGTATACGGAAGGTAGACA TACACTTATTCCTCGGACAG	179–468 (285)	53
<i>T. pectinovorum</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ATATATCTCCAACCTTATATGACCT	8–205 (194)	53
<i>T. vincentii</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AATACTTCTTATGAACATTGAGAC	8–201 (193)	56

### 5.3. ELETROFORESE

A eletroforese foi realizada com oito microlitros de cada produto do PCR em um gel de 1% de agarose em um tampão de 0.5X *Tris-borate-EDTA* a 4 V/cm por 1 hora, corados e visualizados por fotografia em câmara escura. As reações positivas foram determinadas pela presença de bandas nos tamanhos determinados conforme descrito na tabela 1 (bases-pares).

#### **5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Neste estudo foi utilizado o teste exato de Fisher, no qual pudemos avaliar que não foram encontradas associações positivas ou negativas entre as espécies de treponema detectadas (teste Exato de Fischer;  $p > 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

As reações com *primers* universais foram feitas para verificar a presença de bactérias totais. Dos 50 casos iniciais, 35 casos mostraram ser positivos para presença de bactérias. Os resultados referentes aos 35 casos positivos encontram-se na tabela 2.

Dos 35 casos positivos para bactérias totais, treze casos mostraram-se negativos para a presença das espécies: *Treponema socranskii*, *Treponema vicentii*, *Treponema denticola*, *Treponema medium* e *Treponema pectinovorum*.

***Treponema denticola*** foi encontrado em 37% das 35 amostras positivas para bactérias. A figura 1 mostra representativamente a presença e ausência da espécie de *Treponema denticola*.

***Treponema socranskii*** foi encontrado em 37% das 35 amostras positivas para bactérias. A figura 1 mostra representativamente a presença e ausência da espécie de *Treponema socranskii*.

***Treponema vicentii*** foi encontrado em 14% das 35 amostras positivas para bactérias. A figura 1 mostra representativamente a presença e ausência da espécie de *Treponema vicentii*.

***Treponema medium*** foi encontrado em 8% das 35 amostras positivas para bactérias. A figura 1 mostra representativamente a presença e ausência da espécie de *Treponema medium*.

As espécies *Treponema pectinovorum* e *Treponema amylovorum* não foram encontradas nas amostras avaliadas e os primers descritos na literatura mostraram-se inespecíficos.

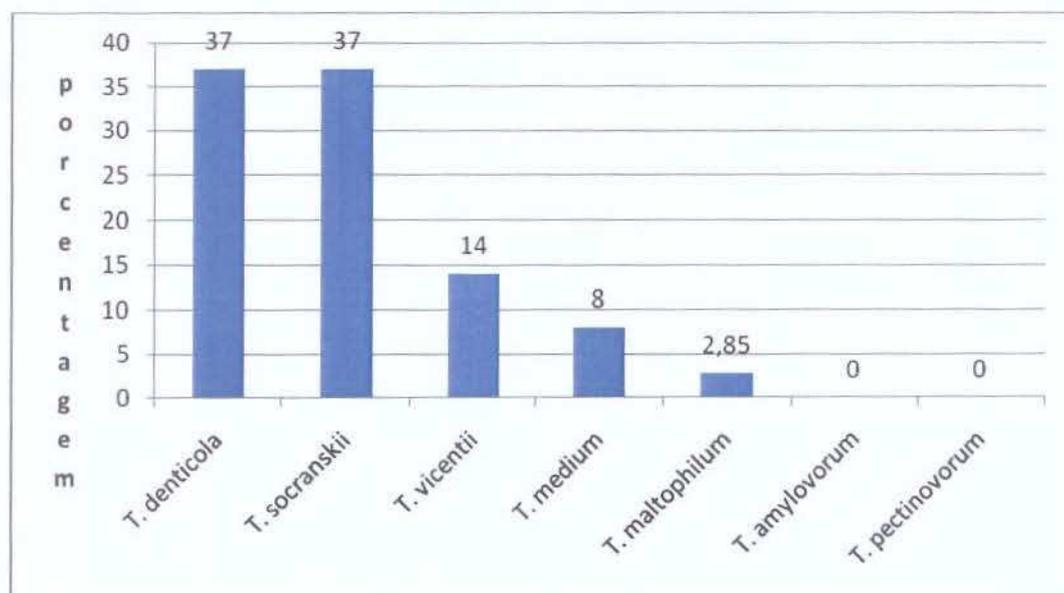
*Treponema maltophilum* foi encontrado em 2,85% das 35 amostras positivas para bactérias. A figura 1 mostra representativamente a presença e ausência da espécie *Treponema maltophilum*.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre as espécies de *Treponema*.

**Tabela 2.** Frequência das espécies de treponema encontradas em 35 canais radiculares com infecções endodônticas primárias

Amostras	<i>Treponema sacranskii</i>	<i>Treponema vicentii</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Treponema medium</i>	<i>Treponema pectinovorum</i>	<i>Treponema amylovarum</i>	<i>Treponema maltophilum</i>
1.	-	-	+	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-	-	-
4.	+	-	+	-	-	-	-
5.	+	-	-	-	-	-	+
6.	+	-	+	+	-	-	-
7.	-	-	+	-	-	-	-
8.	-	-	+	-	-	-	-
9.	-	-	+	+	-	-	-
10.	+	-	-	-	-	-	-
11.	+	+	+	-	-	-	-
12.	+	-	+	+	-	-	-
13.	+	+	-	-	-	-	-
14.	+	-	+	-	-	-	-
15.	-	-	-	-	-	-	-
16.	-	-	-	-	-	-	-
17.	+	-	-	-	-	-	-
18.	-	-	+	-	-	-	-
19.	-	-	+	-	-	-	-
20.	-	-	-	-	-	-	-
21.	-	-	-	-	-	-	-
22.	+	-	-	-	-	-	-
23.	-	-	-	-	-	-	-
24.	-	-	-	-	-	-	-
25.	-	-	-	-	-	-	-
26.	-	-	-	-	-	-	-
27.	-	+	-	-	-	-	-
28.	-	+	-	-	-	-	-
29.	-	+	+	-	-	-	-
30.	+	-	-	-	-	-	-
31.	-	-	-	-	-	-	-
32.	-	-	-	-	-	-	-
33.	+	-	-	-	-	-	-
34.	-	-	-	-	-	-	-
35.	+	-	+	-	-	-	-

A **Figura 1** mostra uma visão geral das espécies encontradas nos 35 canais positivos para presença de bactérias. As espécies mais frequentemente encontradas foram *Treponema denticola* e *Treponema socranskii*, ambas com 37%, seguidas de *T. vicentii* (14%), *T. medium* (8%), *T. maltophilum* (2,85%). As espécies *T. pectinovorum* e *T. amylovorum* não foram encontradas nas amostras avaliadas.



**Figura 1.** Prevalência das espécies de *treponema* encontradas em 35 canais radiculares com necrose pulpar.

## 7. DISCUSSÃO

Alguns dos oligonucleotídeos descritos por Willis et al. (1999) mostraram inepecificidade para identificação de algumas espécies com a presença de bandas com vários pesos moleculares. Com o objetivo de aumentar a especificidade dos primers os protocolos utilizados nesta pesquisa foram ligeiramente modificados.

Primeiramente, a temperatura de anelamento de 54°C, descrita literature para *T. amylovorum* mostrou-se inespecífica. Posteriormente foi tentada a temperatura de 56°C (tentando buscar especificidade) e foi constatada inespecificidade ainda que menor. Tentou-se então o anelamento com 58°C que ainda demonstrou inespecífico, então foi considerado como negativo o resultado para essa espécie.

Com a espécie *Treponema medium* foram realizadas as mesmas tentativas. Primeiramente, a temperatura de anelamento foi de 54°C, a qual foi inespecífica. Posteriormente, a temperatura foi modificada para 55°C, a qual foi inespecífica ainda. Tentou-se então com a temperatura de 58°C a qual mostrou um resultado satisfatório.

Na espécie *Treponema maltophilum* foi feita a primeira reação com 54°C, e o resultado da reação mostrou bandas duplas. Assim, um aumento na temperatura de anelamento foi realizado (55°C) e essa ainda demonstrou bandas duplas. Posteriormente ainda, foi feita uma reação com 58°C quando somente uma banda no tamanho exato de 438 bases pares foi detectada, considerando o resultado satisfatório

Já na espécie *Treponema pectinovorum* tentou-se, primeiramente, a

temperatura de anelamento de 53°C, a qual se mostrou inespecífica. Posteriormente foi feita reação com anelamento de 54°C, na qual foi possível observar que as amostras foram negativas. Esta espécie porém, deixou dúvida se estes microrganismos estavam mesmo ausentes ou se as condições para amplificação do referido par de primers ficou desfavorável para as reações de PCR.

Comparando os resultados desta pesquisa com os de Sakamoto et al. (2009) foi possível observar que suas amostras também foram negativas para *T. pectinovorum*.

Em contrapartida, pôde-se observar que a frequência de *T. maltophilum*, *T. socranskii*, *T. denticola*, e *T. medium* foram superiores às encontradas no presente estudo, provavelmente resultado este relacionado aos diferentes métodos aplicados nas pesquisas.

Em ambos os estudos, no presente e no de Sakamoto et al. (2009), *T. medium* foi encontrado em menor frequência que as outras espécies de treponema, podendo-se concluir que os resultados dependem, além das amostras coletadas, da metodologia aplicada e da especificidade dos primers utilizados.

As interações competitivas ou sinérgicas entre espécies microbianas são complexas, entretanto no presente estudo não pudemos observar essas associações (Teste exato de Fisher;  $p > 0,05$ ) provavelmente devido a grande diversidade microbiana possível de ser encontrada nos canais radiculares, bem como o número relativo de amostras avaliadas.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados das reações de PCR mostram que pelo menos cinco das espécies de treponema estudadas fazem parte da microbiota associada as infecções endodônticas primárias.

As espécies mais frequentemente encontradas em ordem decrescente foram: *Treponema denticola*, *T. socranskii*, *T. vicentii*, *T. medium* e *T. maltophilum*.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Allison MJ, Hammond AC, Jones RJ. Detection of ruminal bacteria that degrade toxic dihydroxypyridine compounds produced from mimosine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:590-4.
2. Caldwell CE, Marquis RE. Oxygen metabolism by *Treponema denticola*. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 66-72.
3. Chan ECS, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 1-9.
4. Centurion-Lara A, Molini BJ, Godornes C, Sun E, Hevner K, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 3377-80.
5. Loesche, WJ The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* 1988; 2: 275-283
6. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Diversity of spirochetes in endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2009; 47:1352-7.
7. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* 1972; 24:638-44.
8. Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Cunha CD, Rosado AS. Novel bacterial phylotypes in endodontic infections. *J Dent Res* 2005;84:565-9.

9. Siqueira JF Jr, Roças IN PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. Arch Oral Biol. 2003; 48: 495-502 (a).
10. Siqueira JF Jr, Roças IN *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod. 2003; 29: 244-7 (b).
11. 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. Bacteriol. 1997; 47: 67-72.
12. Vianna ME, Horz H.-P, Conrads G, Feres M, Gomes B PFA Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23:282-90.
13. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Quantification and characterization of Synergistes in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 260-5.
14. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006; 44:1274-82.
15. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20:253-8.
16. Willis SG, Smith VL, 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; 867-9.
17. Wyss, C, Choi B K, Schupbach P, Guggenheim B, Göbel UB. *Treponema amylovorum* sp. nov., a saccharolytic spirochete of medium size isolated from an advanced human periodontal lesion. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997; 47:842-5.

