

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO BIOMÉDICO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LUCIANA MOURA SASSONE

**MICROBIOTA DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS E SUA RELAÇÃO
COM ASPECTOS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS**

RIO DE JANEIRO

2005

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO BIOMÉDICO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LUCIANA MOURA SASSONE

**MICROBIOTA DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS E SUA RELAÇÃO
COM ASPECTOS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como
um dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Odontologia. Área de concentração: Endodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Rivail Antônio Sérgio Fidel
Prof^ª.Dr^ª Magda Feres

RIO DE JANEIRO

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Moura Sassone

MICROBIOTA DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS E SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS

Rio de Janeiro, 04 de novembro de 2005.

BRENDA DE PAULA GOMES

LUCIENE DE FIGUEIREDO

MAURÍCIO SANTA CECÍLIA

RAPHAEL HIRATA JUNIOR

SANDRA RIVERA FIDEL

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Mario** (*in memoriam*) e **Iria Maria** que me ensinaram as coisas mais importantes que aprendi na vida. Agradeço pelo amor incondicional que sempre me dedicaram.

Ao meu marido, **Fernando Vilhena**, que compartilha comigo sonhos e questionamentos. Companheiro, amigo e incentivador. A você todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Em especial,

Ao meu eterno orientador professor **Rivail Antônio Sérgio Fidel**, que me incentiva a sempre alçar vôos mais altos. Sua amizade, atenção e carinho me são muito importantes. Meu mais sincero agradecimento a você que foi determinante na minha escolha pela pesquisa científica.

A minha querida professora **Sandra Rivera Fidel**, que vem me dando oportunidades desde a graduação. Minha professora, amiga e “mãezona”. Obrigada por se preocupar comigo.

A minha orientadora, professora **Magda Feres**, por sua imensa disponibilidade. Exemplo de competência, dedicação e trabalho. Obrigado pela oportunidade.

AGRADECIMENTOS:

Ao professor de Endodontia da FO-UERJ
Paulo Aloísio Egreja, pela oportunidade de exercer a
docência, pela amizade e pelo excelente convívio
durante todos estes anos;

A professora de Endodontia da FO-UERJ,
Teresa Cristina Ávila Berlinck, exemplo de amor e
dedicação ao magistério, me levando constantemente
a repensar meu papel como docente;

Ao professor de Endodontia da FO-UERJ,
Gustavo Alvares, sempre pronto a ajudar. Amigo
desde os tempos do Mestrado;

**Aos colegas do curso de Doutorado, *Gilberto Campos e Marcos Kalil* pelo
agradável convívio e cooperação. E, em especial, ao colega *Luiz Fernando Fariniuk* pela
amizade que construímos;**

**A diretora da FO-UERJ, professora *Hilda Maria Pontes*, por ter me dado apoio
quando algumas dificuldades se transpuseram no meu caminho. Meu muitíssimo
obrigado;**

**Aos funcionários da pós-graduação da UERJ *José Ângelus de Mendonça, Antônio
e Marcelo Assis* pela atenção e agradável convívio durante estes anos;**

A FO-UERJ, por toda a minha formação, pelo apoio financeiro e institucional;

**A TODOS os meus ex-alunos que me ajudaram durante a fase de coleta das
amostras. Especialmente a *Rafael Guerra, Raquel Ísis e Juliana Cachapuz*.**

**Aos PACIENTES que se prontificaram a participar desta pesquisa sem os quais
não seria possível sua realização;**

A bióloga *Izilvânia M. Q. Barreto*, funcionária do laboratório de pesquisa de pós-graduação da Universidade de Guarulhos (UNG), pela imensurável ajuda durante a etapa laboratorial deste trabalho;

Ao professor *Marcelo De Faveri* pela paciência, atenção e grande ajuda na análise estatística do trabalho;

Aos professores da pós-graduação da UNG, *Cristiane Amaral, Jamil Shibli, José Augusto Rodrigues, Poliana Duarte, Sheila Cortelli e Saulo Geraldeli* por terem sempre me recebido muito bem e em especial a prof^a. *Luciene de Figueiredo* pelas sempre pertinentes observações e sugestões;

A *Fernanda Rapucci*, secretária da pós-graduação em Odontologia da UNG, sempre prestativa e atenciosa;

A Universidade de Guarulhos pela utilização de suas instalações e recursos;

A Universidade Gama Filho, na pessoa do Diretor do Instituto de Odontologia professor *German Villoria*, pela oportunidade profissional e pela possibilidade de coleta de amostras na instituição;

As professoras da disciplina de Endodontia, *Marisa Siciliano e Ana Capanema*, e da disciplina de Prótese Dental do Instituto de Odontologia da Universidade Gama Filho, *Fátima Puppim*, pela grande amizade que nos une, obrigado por estarem sempre presentes em minha vida;

Aos professores da disciplina de Endodontia do Instituto de Odontologia da Universidade Gama Filho, *Antônio José de Azevedo Pereira, Maurício Santa Cecília e Marcelo Mangelli* pelas oportunidades profissionais, pela amizade e pela excelente convivência;

Aos professores do Instituto de Odontologia da Universidade Gama Filho, *Karla Baumotte, Marília Passos, Maurício Vasconcellos, Paulo Garcia, Fabiano Malafaia,*

Marcelo Garbossa, Cláudio Maia, Felipe de Abreu, Gisele Damiana, Marcelo Ribeiro, Lucia Helena e Rogério Fulgêncio, colegas das disciplinas de Endodontia e Clínica Integrada, pela constante troca de conhecimentos e pelas ótimas horas que passamos juntos;

A UNIGRANRIO, na pessoa da Diretora da Faculdade de Odontologia, professora *Anadir Cordeiro Herdy*, por ter aberto as portas da sua escola para que eu pudesse fazer as coletas de amostras;

Aos professores da Disciplina de Endodontia da UNIGRANRIO, *Edson Jorge Moreira, Ricardo Guimarães, Katiana Accioly e Cláudio Varela* pelo excelente modo como me receberam neste período e em especial a amiga *Luciane Kac Sjmazer*, por sua amizade e ajuda;

Aos alunos da UNIGRANRIO que me ajudaram durante a fase de coleta das amostras;

A professora *Ana Paula Colombo* por ter cedido o DNA de *Enterococcus faecalis*;

A minha amiga *Volúcia Prado*, pela amizade e por ter “dividido” comigo sua orientadora;

A meus sogros *Marly e Alfredo Vilhena*, minha cunhada *Denise Vieira* e meu padraсто *Carlos Alberto Batista* por serem pessoas tão solícitas e estarem sempre prontos a me ajudar;

Aos mestrandos da FO-UERJ *Rosilea Graneiro, Maria Regina Japiassú, Carlos Eduardo, Flavio Diblase, Marco André e Pablo Sotelo* e aos professores *Maria Isabel Senne e Marco Antonio Alencar*, pela amizade e ótimas horas de convívio;

E, principalmente a Deus, por me achar merecedora da vida que me deu.

RESUMO

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a composição da microbiota presente em infecções endodônticas primárias, buscando relacioná-las com alguns aspectos clínicos, como presença de dor, fístula, estado da câmara pulpar, presença e tamanho de lesão perirradicular. Foram selecionados 111 casos de dentes unirradiculares com polpas necróticas que apresentavam ou não sintomatologia ou rarefação periapical. As amostras foram coletadas dos canais radiculares com o auxílio de limas tipo Hedström #15 e de duas pontas de papel absorvente estéril introduzidas até 1mm aquém do forame apical. A presença de até 40 espécies bacterianas foi determinada em cada uma das amostras, por meio da utilização de sondas de DNA e da técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Os testes de *Mann-Whitney* e *t*-independente foram utilizados para avaliar as diferenças entre prevalência, os níveis e as proporções das espécies ou grupos de espécies testadas e as condições clínicas avaliadas. Foi encontrada uma média de 22 espécies diferentes por amostra. *E. faecalis*, *C. gracilis*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. melaninogenica* e *F. nucleatum sp. vincentii* foram as espécies mais prevalentes, e as espécies encontradas em níveis médios mais altos foram *F. nucleatum sp. vincentii*, *E. saburreum*, *E. faecalis*, *N. mucosa*, *V. parvula*, *C. gracilis*, *T. socranskii*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *M. micros*, *P. nigrescens* e *F. nucleatum sp. nucleatum*. *T. forsythensis* estava em nível significativamente mais alto nos casos de dor ($p < 0,05$); *E. faecalis*, *S. anginosus*, *C. sputigena* e *C. gingivalis* nos casos de ausência de fístula ($p < 0,05$); *F. nucleatum sp. vincentii* e *C. ochracea* nos casos de câmara pulpar fechada ($p < 0,05$) e *S. intermedius* e *A. naeslundii* nos casos de lesões $\geq 20\text{mm}^2$ ($p < 0,05$). Nos casos de dor presente, foram encontrados também níveis totais bacterianos mais altos e uma proporção mais elevada do complexo vermelho ($p < 0,05$). Nos casos de lesões $\geq 20\text{mm}^2$ foi encontrada uma proporção mais elevada do grupo azul ($p < 0,05$). Baseado nos resultados obtidos parece-nos lícito concluir que a microbiota de infecções endodônticas primárias apresenta grande variedade de espécies e que algumas delas podem estar relacionadas com características clínicas apresentadas nestes mesmos processos patológicos.

Palavras-chaves: Bactérias, Endodontia, Sondas de DNA, Sintomas clínicos.

ABSTRACT

Microbiota of primary endodontic infections and its relationship with clinical and radiographic aspects

The aim of the present study was to evaluate the composition of the microbiota of primary endodontic infections and the relationship between the bacterial species and some clinical aspects such as presence of pain, *sinus tract*, pulp chamber *status* and presence and size of perirradicular lesion. One hundred and eleven cases of single-rooted teeth with necrotic pulp presenting or not pain or perirradicular lesion were selected. Samples were collected from the root canals with the use of #15 Hedström-type file and two sterile paper points which were introduced up to 1 mm before the apical foramen. The presence of 40 bacterial species in each specimen was determined using DNA probes and Checkerboard DNA-DNA hybridization technique. Mann-Whitney and independent t-test were used to evaluate differences among prevalence, levels and proportions of bacterial species or groups of species and clinical conditions. There were found a mean of 22 different species per sample. *E. faecalis*, *C. gracilis*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. melaninogenica* and *F. nucleatum sp. vincentii* were the most prevalent species, and the species found in highest mean levels were *F. nucleatum sp. vincentii*, *E. saburreum*, *E. faecalis*, *N. mucosa*, *V. parvula*, *C. gracilis*, *T. socranskii*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *M. micros*, *P. nigrescens* and *F. nucleatum sp. nucleatum*. *T. forsythensis* was present in higher levels in cases of presence of pain ($p < 0.05$); *E. faecalis*, *S. anginosus*, *C. sputigena* and *C. gingivalis* in cases of absence of *sinus tract* ($p < 0.05$); *F. nucleatum sp. vincentii* and *C. ochracea* in cases of unexposed pulp chamber ($p < 0.05$) and *S. intermedius* and *A. naeslundii* in cases of perirradicular lesions $\geq 20\text{mm}^2$ ($p < 0.05$). In cases of presence of pain, higher total microbial levels and higher proportions of red complex were also found ($p < 0.05$). In cases of perirradicular lesions $\geq 20\text{mm}^2$, a higher proportion of blue complex was detected ($p < 0.05$). Based on these results we could conclude that the primary endodontic infections presents a large variety of bacterial species and some of them may be related with the clinical aspects of these pathological process.

Key-words: Bacteria, Endodontics, DNA probes, Symptoms, Clinical.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1- INTRODUÇÃO	32
2- REVISÃO DA LITERATURA	36
3- PROPOSIÇÃO	62
4- MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1 – Seleção da amostra e desenho experimental	65
4.2 – Exame clínico e radiográfico	66
4.3 – Avaliação microbiológica	66
4.3.1 – Coleta das amostras	66
4.3.2 – Determinação dos microrganismos orais utilizando a técnica do <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	69
4.3.3 – Detecção das espécies	75
4.4 – Análise dos dados	76
5- RESULTADOS	77
6- DISCUSSÃO	113
6.1 – Prevalência das espécies	114
6.2 – Contagem dos níveis das espécies	120
6.3 – Avaliação dos grupos e complexos microbianos	122
6.4 – Relação da microbiota com sinais e sintomas clínicos	123
6.4.1) Presença ou ausência de dor	123
6.4.2) Presença ou ausência de fístula	124
6.4.3) Câmara pulpar aberta ou fechada	124
6.4.4) Tamanho da lesão perirradicular	125
6.5 – Comparação entre as técnicas de diagnóstico microbiológico	125
6.6 – Considerações finais	127
7-CONCLUSÕES	128
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
9- ANEXO I	138
10- APÊNDICES	140

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 **ório; b, c – Coleta de material do canal radicular com o auxílio de lima H sem cabo e pinça porta-agulha; d – Colocação da lima em Eppendorf contendo TE; e – Coleta de material com o auxílio de cone de papel; f- Colocação de cone de papel em Eppendorf contendo TE.** 68
- FIGURA 2 Representação gráfica do *Minislot* 30[®] e resumo da preparação e deposição das amostras nas canaletas do *Minislot* 30[®], sobre a membrana de *nylon* (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*). 70
- FIGURA 3 Fotografia da colocação das amostras de infecções endodônticas primárias nas canaletas do *Minislot* 30[®], sobre a membrana de *nylon*. 70
- FIGURA 4 Representação gráfica do *Miniblotter* 45[®] e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*). 73
- FIGURA 5 **FOTOGRAFIA DA COLOCAÇÃO DAS SONDAS DE DNA PERPENDICULARMENTE AS AMOSTRAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS JÁ PREVIAMENTE FIXADAS, NA MEMBRANA DE NYLON, NO MINIBLOTTER 45[®].** 73
- FIGURA 6 Representação gráfica do padrão de hibridização das sondas de DNA com as bactérias presentes nas amostras dos canais radiculares em forma de tabuleiro de xadrez (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*). 74

FIGURA 7 Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de canais radiculares e as sondas de DNA (técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*). 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano.	72
TABELA 2	ÍNDICE UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE MICRORGANISMOS NAS AMOSTRAS DOS CANAIS RADICULARES E SEUS VALORES NUMÉRICOS CORRESPONDENTES.	76
TABELA 3	Prevalência (em porcentagem) das espécies bacterianas avaliadas nas 111 amostras, nos casos assintomáticos, sintomáticos e nos casos de ausência ou de presença de lesão perirradicular.	80
TABELA 4	Prevalência (em porcentagem) das espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença ou ausência de fístula e de câmara coronária aberta ou fechada.	81
TABELA 5	Média da contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das espécies bacterianas avaliadas nas 111 amostras, nos casos assintomáticos, sintomáticos e nos casos de lesões perirradiculares $< 20\text{mm}^2$ ou $\geq 20\text{mm}^2$.	84
TABELA 6	Média da contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença ou ausência de fístula e de câmara coronária aberta ou fechada.	85

TABELA 7 Divisão das 40 espécies bacterianas em gêneros ou grupos. 100

TABELA 8 Divisão das 40 espécies bacterianas nos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (1998, 106 2002).

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Prevalência das 40 espécies bacterianas presentes nas 111 amostras avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de contagem, assim como apresentado no GRÁFICO 2.	82
GRÁFICO 2	Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas presentes nas 111 amostras avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de contagem.	86
GRÁFICO 3	Porcentagem da contagem de sondas de DNA microbiano das 40 espécies bacterianas avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de contagem, assim como apresentado no GRÁFICO 2.	87
GRÁFICO 4	Média total dos níveis ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de ausência e presença de dor ($p < 0,05$; teste t).	89
GRÁFICO 5	Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença e ausência de dor (* $p < 0,05$; teste <i>Mann-Whitney</i>).	90
GRÁFICO 6	Média total dos níveis ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de ausência e presença de fístula ($p > 0,05$; teste t).	92
GRÁFICO 7	Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de	

	presença e ausência de fístula (* $p < 0,05$; teste <i>Mann-Whitney</i>).	93
GRÁFICO 8	Média total dos níveis ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de câmara pulpar aberta e câmara pulpar fechada ($p > 0,05$; teste t).	95
GRÁFICO 9	Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de câmara pulpar aberta e câmara pulpar fechada (* $p < 0,05$; teste <i>Mann-Whitney</i>).	96
GRÁFICO 10	Média total do níveis ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de lesões $< 20\text{mm}^2$ e lesões $\geq 20\text{mm}^2$. ($p > 0,05$; teste t).	98
GRÁFICO 11	Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de lesões $< 20\text{mm}^2$ e lesões $\geq 20\text{mm}^2$ (* $p < 0,05$; teste <i>Mann-Whitney</i>).	99
GRÁFICO 12	Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas agrupadas por gênero nas 111 amostras. (STREPTOS - Streptococcus; PREVO - Prevotella; PATOG - patógenos; FUSOS - <i>Fusobacterium</i> ; CAPNOS - <i>Capnocytophaga</i> ; CAMPY - <i>Campylobacter</i> ; ACTINOS - <i>Actinomyces</i> - grupos bacterianos descritos na TABELA 7).	101
GRÁFICO 13	Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas, agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com ausência e presença de dor (STREPTOS-	

Streptococcus; **PREVO-** *Prevotella*; **PATOG** – patógenos; **FUSOS** – *Fusobacterium*; **CAPNOS** – *Capnocytophaga*; **CAMPY** – *Campylobacter*; **ACTINOS** – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam dor ausente e valores numéricos pretos dor presente. (* p < 0,05, teste de *Mann-Whitney*). 102

GRÁFICO 14 Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas, agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com ausência ou presença de fístula (**STREPTOS-** *Streptococcus*; **PREVO-** *Prevotella*; **PATOG** – patógenos; **FUSOS** – *Fusobacterium*; **CAPNOS** – *Capnocytophaga*; **CAMPY** – *Campylobacter*; **ACTINOS** – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam fístula presente e valores numéricos pretos fístula ausente (* p < 0,05, teste *Mann-Whitney*). 103

GRÁFICO 15 Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com câmara pulpar aberta ou câmara pulpar fechada (**STREPTOS-** *Streptococcus*; **PREVO-** *Prevotella*; **PATOG** – patógenos; **FUSOS** – *Fusobacterium*; **CAPNOS** – *Capnocytophaga*; **CAMPY** – *Campylobacter*; **ACTINOS** – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam câmara aberta e valores numéricos pretos câmara fechada (* p < 0,05, teste *Mann-Whitney*). 104

GRÁFICO Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas, agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com lesões $< 20\text{mm}^2$ e lesões $\geq 20\text{mm}^2$ (**STREPTOS**-*Streptococcus*; **PREVO**-*Prevotella*; **PATOG** – patógenos; **FUSOS** – *Fusobacterium*; **CAPNOS** – *Capnocytophaga*; **CAMPY** – *Campylobacter*; **ACTINOS** – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam lesões $< 20\text{mm}^2$ e valores numéricos pretos lesões $\geq 20\text{mm}^2$. (* $p < 0,05$, teste *Mann-Whitney*). 105

GRÁFICO Média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.* (1998, 2002)^{60, 59} presentes nas 111 amostras avaliadas (grupos bacterianos descritos na TABELA 8). 107

GRÁFICO 18 Média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (grupos bacterianos descritos na TABELA 8) presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com presença ou ausência de sintomatologia dolorosa (* $p < 0,05$; teste *Mann-Whitney*). 109

GRÁFICO 19 Média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (grupos bacterianos descritos na TABELA 8) presentes nas amostras de canais radiculares com ausência ou presença de fístula (** $p < 0,01$; teste *Mann-Whitney*). 110

GRÁFICO 20 Média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (grupos bacterianos descritos na TABELA 8) presentes nas

amostras de canais radiculares com câmara coronária 111
aberta ou fechada ($p > 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

GRÁFICO 21 Média das proporções dos complexos microbianos
descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (grupos
bacterianos descritos na TABELA 8) presentes nas
amostras de canais radiculares com em dentes com
lesões $< 20\text{mm}^2$ ou $\geq 20\text{mm}^2$ (* $p < 0,05$; teste *Mann-* 112
Whitney).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviaturas

A. actinomycetencomitans

A. gerencseriae

A. israelii

A. naeslundii

A. odontolyticus

A. odontolyticus I

ATCC

A. viscosus

B. assacharolyticus

B. buccae

B. denticola

B. endodontalis

B. forsythus

B. fragilis

B. gingivalis

B. intermedius

B. melaninogenicus

B. oralis

BPPN

C. matruchotii

C. gingivalis

C. gracilis

C. ochracea

C. rectus

C. showae

C. sputigena

D. pneumosites

E. aerofasciens

E. alantolyticum

E. coli

E. corrodens

E. faecalis

Nomes por extenso

Actinobacillus actinomycetencomitans

Actinomyces gerencseriae

Actinomyces israelii

Actinomyces naeslundii

Actinomyces odontolyticus

Actinomyces odontolyticus I

American Type Culture Collection

Actinomyces viscosus

Bacteroides assacharolyticus

Bacteroides buccae

Bacteroides denticola

Bacteroides endodontalis

Bacteroides forsythus

Bacteroides fragilis

Bacteroides gingivalis

Bacteroides intermedius

Bacteroides melaninogenicus

Bacteroides oralis

Bacilos Produtores de Pigmento Negro

Corynebacterium matruchotii

Capnocytophaga gingivalis

Campylobacter gracilis

Capnocytophaga ochracea

Campylobacter rectus

Campylobacter showae

Capnocytophaga sputigena

Dialister pneumosites

Eubacterium aerofasciens

Eubacterium alantolyticum

Escherichia coli

Eikenella corrodens

Enterococcus faecalis

<i>E. lentum</i>	<i>Eubacterium lentum</i>
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
<i>E. saburreum</i>	<i>Eubacterium saburreum</i>
EPM	Erro Padrão da Média
FDC	Forsyth Dental Center
<i>F. fusiforme</i>	<i>Fusobacterium fusiforme</i>
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum</i>
<i>F. nucleatum sp</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp</i>
<i>polymorphum</i>	<i>polymorphum</i>
<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum sp vincentii</i>
<i>F. periodonticum</i>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>F. varium</i>	<i>Fusobacterium varium</i>
<i>G. morbillorum</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>H. aphrophilus</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>
<i>L. buccalis</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>M. micros</i>	<i>Micromonas micros</i>
<i>N. mucosa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>P. acnes I</i>	<i>Propionibacterium acnes I</i>
<i>P. alactolyticus</i>	<i>Pseudomonas alactolyticus</i>
<i>P. anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>P. buccae</i>	<i>Prevotella buccae</i>
<i>P. endodontalis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. magnus</i>	<i>Peptococcus magnus</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>P. micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>P. morbillorum</i>	<i>Peptococcus morbillorum</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>

<i>P. oralis</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>P. propionica</i>	<i>Propionibacterium propionica</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>S. anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>S. faecalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>S. milleri</i>	<i>Streptococcus milleri</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. noxia</i>	<i>Selenomonas noxia</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. sputigena</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>
<i>T. amylovorum</i>	<i>Treponema amylovorum</i>
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
TE	
<i>T. forsythensis</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>
<i>T. lecithinolyticum</i>	<i>Treponema lecithinolyticum</i>
<i>T. maltophilum</i>	<i>Treponema maltophilum</i>
<i>T. medium</i>	<i>Treponema medium</i>
<i>T. pectinovorum</i>	<i>Treponema pectinovorum</i>
<i>T. socranskii</i>	<i>Treponema socranskii</i>
<i>T. vincentii</i>	<i>Treponema vincentii</i>
<i>V. parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>W. recta</i>	<i>Wolinella recta</i>

INTRODUÇÃO

1- Introdução:

As infecções microbianas do tecido pulpar, geralmente em consequência da cárie dentária, são as principais causas do tratamento endodôntico. Bactérias e seus produtos são fatores críticos no desenvolvimento de alterações pulpares e periapicais. Esses processos patológicos são, geralmente, de origem inflamatória e inúmeros fatores podem ser responsáveis pela sua indução, tais como: fatores mecânicos/físicos, químicos e microbianos. Entretanto, apenas os microrganismos são capazes de perpetuar estas alterações⁴³.

O efeito nocivo dos microrganismos no tecido pulpar vem sendo tema de estudo desde 1894, quando MILLER²⁸ comprovou a presença de bactérias no interior dos canais radiculares, salientando a importância dos mesmos na etiologia das alterações pulpo-periapicais. Apesar disto, apenas em 1965, o estudo clássico de KAKEHASHI *et al.*²⁶, comprovou a importância da presença de microrganismos na instalação de processos patológicos pulpares e periapicais e estabeleceu uma associação entre eles. Os autores realizaram exposições pulpares em ratos *germ-free* e convencionais de laboratório e observaram necrose pulpar, formação de abscessos e granulomas apenas nos ratos convencionais.

Até o início da década de 70, acreditava-se que os principais patógenos endodônticos eram microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, devido à carência de técnicas adequadas para isolamento, incubação e cultivo de anaeróbios estritos⁴⁰.

Apenas em 1976, SUNDQVIST⁶⁴ demonstrou só haver formação de lesões periapicais em dentes com cultura positiva, comprovando a dependência da presença de microrganismos no aparecimento de lesões periapicais. O autor destacou também a importância das bactérias anaeróbias estritas nos processos patológicos pulpares e periapicais.

A melhoria das técnicas tradicionais de cultura de microrganismos anaeróbios permitiu um maior detalhamento da microbiota presente nas infecções endodônticas intra e extrarradiculares. Entretanto, estas bactérias são extremamente difíceis de serem mantidas viáveis após a coleta e de serem cultivadas em laboratório. Essas dificuldades técnicas limitam os estudos microbiológicos que utilizam técnicas convencionais de cultura a um número de amostras e de microrganismos avaliados normalmente muito reduzido.

A partir da década de 90, métodos moleculares têm sido empregados para investigar a microbiota endodôntica. SOCRANSKY *et al.*⁶²(1994) e HAFFAJEE *et al.*²¹(1997) descreveram recentemente a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para detecção de microrganismos orais na placa subgengival de indivíduos com diferentes formas de doença ou saúde periodontal. Essa técnica utiliza sondas de DNA e permite a identificação e quantificação de até 45 espécies de microrganismos em até 28 amostras de placa de uma única vez.

Analisando dados do laboratório de microbiologia do *Forsyth Institute* (Boston, EUA) entre os anos de 1969 e 1999, pode-se observar que, utilizando métodos de cultura relativamente modernos, 300 amostras de placa bacteriana foram avaliadas em um período de seis anos, entre 1982 e 1988. Quando o primeiro método de sondas de DNA, *colony lift*, foi implantado, em 1988, o número de amostras de placa bacteriana avaliado subiu para 9.600, entre 1988 e 1993. A técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi introduzida em 1993 e foi utilizada para avaliar 34.400 amostras de placa entre 1993 e 1999^{61, 62}.

Além de permitir a avaliação de um grande número de amostras e de espécies de microrganismos, a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* é de fácil manuseio, possibilita a quantificação microbiana, requer um curto espaço de tempo para sua execução e possui baixo custo em relação às técnicas de cultura tradicionais. Uma outra vantagem deste

método é o fato de não ser necessário trabalhar com microrganismos viáveis, mas somente com o DNA bacteriano preservado⁶².

Estudos que utilizem métodos moleculares podem levar a um melhor entendimento da composição da microbiota associada às alterações pulpo-periapicais. Este conhecimento, por sua vez, permitirá a elaboração de terapias mais específicas, fundamentadas nos fatores etiológicos destas infecções.

PROPOSIÇÃO

3- Proposição:

Baseado nos achados da literatura pertinente, o presente trabalho teve por objetivos:

- 1- Avaliar a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias;
- 2- Correlacionar os dados microbiológicos com sinais e sintomas clínicos observados na amostra.

RESULTADOS

5 – Resultados:

No presente estudo foram utilizadas 111 amostras de canais radiculares com necrose pulpar de dentes unirradiculares, entre eles incisivos superiores e inferiores, caninos superiores e inferiores e primeiros pré-molares inferiores. A amostra abrangeu pacientes entre 18 e 80 anos (média de 36,49 anos) sendo 71 do sexo feminino e 41 do sexo masculino. Os dados clínicos analisados no presente trabalho, assim como o número de espécies bacterianas presentes em cada amostra estão apresentadas no APÊNDICE IV. O número de bactérias presentes nos casos analisados variou de uma a quarenta espécies, sendo a média de 22 bactérias por amostra. As espécies presentes nos únicos casos de mono-infecção foram a *P. nigrescens* (caso 53, APÊNDICE IV) e *N. mucosa* (casos 82 e 83, APÊNDICE IV).

Dos casos selecionados 81 eram assintomáticos e trinta apresentavam algum tipo de sintomatologia (um caso de relato de dor espontânea, 22 casos de dor provocada e sete casos de relato de dor espontânea e dor provocada). Lesão periapical estava presente em 103 casos e ausente em oito. Presença de fístula foi verificada em 15 casos e em 29 casos as câmaras pulpares se encontravam aberta à cavidade oral.

No único caso de relato de dor espontânea foram detectadas 38 espécies bacterianas e havia presença de lesão perirradicular. Nos casos de relato de dor espontânea e dor provocada (n= 7) o número de espécies bacterianas variou de cinco a 36, numa média de 24 espécies, todos apresentando lesão perirradicular. Nos casos de dor provocada (n= 22) o número de espécies variou entre uma e 36 com média de 19 espécies bacterianas.

A prevalência das bactérias foi inicialmente analisada em termos de porcentagem levando-se em consideração apenas sua presença ou ausência. As

TABELAS 3 e 4 e o GRÁFICO 1 mostram a prevalência das espécies avaliadas nas 111 amostras, e em cada uma das sintomatologias clínicas. Algumas espécies demonstraram alta prevalência, sendo elas *E. faecalis* (89,3%), *C. gracilis* (89,3%), *L. buccalis* (89,3%), *N. mucosa* (87,5%), *P. melaninogenica* (86,6%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (85,7%).

Estas mesmas bactérias foram sempre as mais prevalentes nos diferentes aspectos clínicos analisados, apresentando discretas alterações nas suas porcentagens de acordo com a situação clínica. Nos casos assintomáticos a prevalência dessas espécies seguiu a seguinte ordem: *C. gracilis* (96,7%), *L. buccalis* (90%), *N. mucosa* (90%), *P. melaninogenica* (86,5%), *N. mucosa* (86,6%), *E. faecalis* (83,3%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (83,3%) e nos casos sintomáticos *E. faecalis* (91,5%), *L. buccalis* (89%), *P. melaninogenica* (87,5%), *V. parvula* (87,5%), *C. gracilis* (86,6%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (86,6%). Nos casos de ausência de fístula: *E. faecalis* (89,7%), *C. gracilis* (88,7%), *L. buccalis* (88,7%), *N. mucosa* (87,6%), *P. melaninogenica* (86,6%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (83,5%) e, nos casos de presença de fístula, a espécie *F. nucleatum* sp. *vincentii* esteve presente em 100% dos casos além da presença em alta prevalência de *C. gracilis* (93,3%), *L. buccalis* (93,3%), *E. faecalis* (86,7%), *N. mucosa* (86,7%) e *P. melaninogenica* (86,7%). Já nos casos de câmara coronária fechada foi observado *E. faecalis* (89%), *C. gracilis* (87,8%), *L. buccalis* (86,6%), *N. mucosa* (85,4%), *P. melaninogenica* (84,1%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (84,1%). Nos casos de câmara coronária aberta: *L. buccalis* (96,7%), *P. melaninogenica* (93,3%), *C. gracilis* (93,3%), *N. mucosa* (93,3%), *E. faecalis* (90%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (90%) (TABELAS 3 e 4).

Quando se buscou analisar a presença e a ausência de lesão perirradicular houve uma pequena alteração nas espécies mais prevalentes. Nos casos de lesão

ausente, a espécie *N. mucosa* esteve presente em 100% dos casos, seguida de *C. gracilis* (87,5%), *L. buccalis* (87,5%), *P. melaninogenica* (87,5%). Além disso, a espécie *V. parvula*, diferentemente do que ocorreu nos demais aspectos clínicos analisados, também se mostrou bastante prevalente (87,5%). A espécie *A. actinomycetemcomitans* não esteve presente em nenhum caso de ausência de lesão perirradicular. Nos casos de lesão presente, as espécies mais prevalentes foram: *E. faecalis* (90,4%), *C. gracilis* (89,4%), *L. buccalis* (89,4%), *N. mucosa* (86,5%), *P. melaninogenica* (86,5%) e *F. nucleatum* sp. *vincentii* (85,6%) (TABELA 3).

Em relação ao parâmetro dor, foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na prevalência de *E. corrodens*, *T. socranskii*, *S. constellatus* e *A. israelii* (os dois primeiros mais prevalentes em casos sintomáticos e os dois últimos em casos assintomáticos) (TABELA 3). Já quando se buscou relacionar a presença ou ausência de fístula com a prevalência de alguma espécie bacteriana, nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada (TABELA 4). Nos casos da câmara pulpar encontrar-se aberta ou fechada ao meio oral, foi verificada diferença estatisticamente significativa para *A. actinomycetemcomitans*, *T. socranskii*, *T. forsythensis*, *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *N. mucosa*, *S. mitis* e *E. corrodens*. Todos mais prevalentes em casos de câmara aberta. Com relação à presença de lesão, apenas houve diferença estatisticamente significante para *C. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, que mostraram uma maior prevalência nos casos que apresentavam lesão perirradicular (TABELA 3).

TABELA 3 – Prevalência (em porcentagem) das espécies bacterianas avaliadas nas 111 amostras, nos casos assintomáticos, sintomáticos e nos casos de ausência ou de presença de lesão perirradicular.

	Espécie	Amostra geral (n=111)	Assintomáticos (n= 81)	Sintomáticos (n= 30)	Lesão ausente (n= 8)	Lesão presente (n= 103)
1	<i>E. faecalis</i>	89,3	83,3	91,5	75,0	90,4
2	<i>C. gracilis</i>	89,3	96,7	86,6	87,5	89,4
3	<i>L. buccalis</i>	89,3	90,0	89,0	87,5	89,4
4	<i>N. mucosa</i>	87,5	90,0	86,6	100,0	86,5
5	<i>P. melaninogenica</i>	86,6	86,5	87,5	87,5	86,5
6	<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	85,7	83,3	86,6	87,5	85,6
7	<i>E. saburreum</i>	75,9	79,3	75,6	75,0	76,7
8	<i>S. anginosus</i>	75,0	76,0	62,5	62,5	76,0
9	<i>V. parvula</i>	74,1	73,1	87,5	87,5	73,1
10	<i>C. sputigena</i>	67,9	63,3	69,5	62,5	68,3
11	<i>P. gingivalis</i>	67,0	74,4	46,7	37,5	69,2
12	<i>T. forsythensis</i>	65,2	63,3	65,9	62,5	65,4
13	<i>S. mitis</i>	65,2	60,0	67,1	62,5	65,4
14	<i>F. periodonticum</i>	63,4	60,0	64,6	50,0	64,4
15	<i>P. nigrescens</i>	61,6	63,3	61,7	37,5	64,1
16	<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	60,7	60,0	61,0	37,5	62,5
17	<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	59,8	53,3	62,2	75,0	58,7
18	<i>A. odontolyticus I</i>	58,0	51,7	65,8	50,0	62,6
19	<i>P. intermedia</i>	58,0	53,3	59,8	75,0	56,7
20	<i>G. morbillorum</i>	57,1	53,3	58,5	50,0	57,7
21	<i>C. showae</i>	56,3	50,0	58,5	50,0	56,7
22	<i>S. gordonii</i>	55,4	40,0	61,0	62,5	54,8
23	<i>T. denticola</i>	53,6	70,0	47,6	62,5	52,9
24	<i>S. noxia</i>	52,7	53,8	37,5	37,5	53,8
25	<i>E. corrodens</i>	51,8	26,7*	61,0*	62,5	51,0
26	<i>C. gingivalis</i>	50,9	53,3	50,0	62,3*	58,8*
27	<i>E. nodatum</i>	50,0	50,0	50,0	37,5	51,0
28	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	47,3	36,7	51,2	0,0*	51,0*
29	<i>M. micros</i>	46,4	36,7	50,6	37,5	47,6
30	<i>S. constellatus</i>	42,0	48,8*	23,3*	50,0	41,3
31	<i>C. rectus</i>	41,1	23,3	47,6	37,5	41,3
32	<i>T. socranskii</i>	35,7	20,0*	44,2*	41,0	41,2
33	<i>S. oralis</i>	33,9	20,0	39,0	37,5	33,7
34	<i>P. endodontalis</i>	30,4	30,0	30,5	25,0	30,8
35	<i>C. ochracea</i>	29,5	16,7	34,1	25,0	29,8
36	<i>P. acnes I</i>	29,5	26,7	30,5	50,0	27,9
37	<i>A. israelii</i>	27,7	50,0*	19,5*	25,0	27,9
38	<i>S. intermedius</i>	24,1	33,3	20,7	50,0	22,1
39	<i>A. naeslundii</i>	17,0	15,9	23,1	14,3	17,8
40	<i>A. gerencseriae</i>	15,2	6,7	18,3	12,5	15,4

* espécies que apresentam diferença estatisticamente significativa (teste *Mann-Whitney* – $p \leq 0.05$).

TABELA 4 – Prevalência (em porcentagem) das espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença ou ausência de fístula e de câmara coronária aberta ou fechada.

	Espécie	Fístula ausente (n= 96)	Fístula presente (n= 15)	Câmara aberta (n= 29)	Câmara fechada (n= 82)
1	<i>E. faecalis</i>	89,7	86,7	90,0	89,0
2	<i>C. gracilis</i>	88,7	93,3	93,3	87,8
3	<i>L. buccalis</i>	88,7	93,3	96,7	86,6
4	<i>N. mucosa</i>	87,6	86,7	93,3*	85,4*
5	<i>P. melaninogenica</i>	86,6	86,7	93,3	84,1
6	<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	83,5	100,0	90,0	84,1
7	<i>E. saburreum</i>	77,1	73,3	80,0	75,3
8	<i>S. anginosus</i>	74,2	80,0	76,7	74,4
9	<i>V. parvula</i>	77,3	53,3	70,0	75,6
10	<i>C. sputigena</i>	66,0	80,0	73,3	65,9
11	<i>P. gingivalis</i>	66,0	73,3	73,3	64,6
12	<i>T. forsythensis</i>	64,9	66,7	50,0*	70,7*
13	<i>S. mitis</i>	62,9	80,0	76,7*	61,0*
14	<i>F. periodonticum</i>	60,8	80,0	66,7	62,2
15	<i>P. nigrescens</i>	61,5	66,7	53,3	65,4
16	<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	61,9	53,3	60,0	61,0
17	<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	59,8	60,0	63,3	58,5
18	<i>A. odontolyticus I</i>	60,0	73,3	57,1	63,6
19	<i>P. intermedia</i>	57,7	60,0	60,0	57,3
20	<i>G. morbillorum</i>	54,6	73,3	56,7	57,3
21	<i>C. showae</i>	56,7	53,3	63,3	53,7
22	<i>S. gordonii</i>	54,6	60,0	66,7	51,2
23	<i>T. denticola</i>	53,6	53,3	46,7	56,1
24	<i>S. noxia</i>	53,6	46,7	56,7	51,2
25	<i>E. corrodens</i>	52,6	46,7	66,7*	46,3*
26	<i>C. gingivalis</i>	51,5	46,7	46,7	52,4
27	<i>E. nodatum</i>	51,5	40,0	56,7	47,6
28	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	49,5	33,3	60,0*	42,7*
29	<i>M. micros</i>	45,8	53,3	53,3	44,4
30	<i>S. constellatus</i>	43,3	33,3	53,3	37,8
31	<i>C. rectus</i>	44,3	20,0	43,3	40,2
32	<i>T. socranskii</i>	39,8	21,4	48,3*	33,3*
33	<i>S. oralis</i>	35,1	26,7	40,0	31,7
34	<i>P. endodontalis</i>	32,0	20,0	26,7	31,7
35	<i>C. ochracea</i>	32,0	13,3	33,3	28,0
36	<i>P. acnes I</i>	28,9	33,3	40,0	25,6
37	<i>A. israelii</i>	25,8	40,0	40,0*	23,2*
38	<i>S. intermedius</i>	24,7	20,0	23,3	24,4
39	<i>A. naeslundii</i>	16,1	26,7	25,9	14,8
40	<i>A. gerencseriae</i>	14,4	20,0	36,7*	7,3*

* espécies que apresentam diferença estatisticamente significativa (teste *Mann-Whitney* – $p \leq$

0.05).

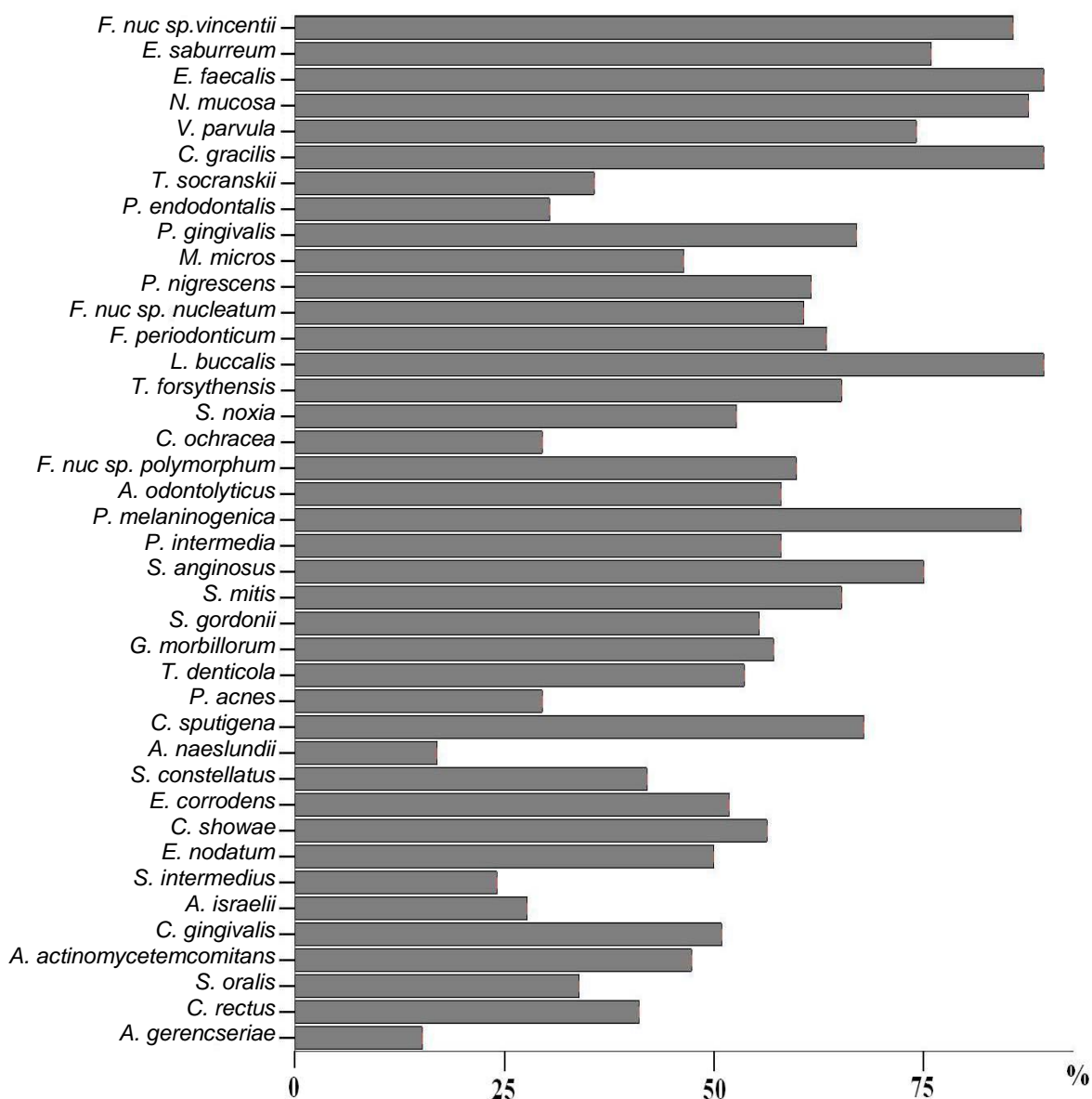


GRÁFICO 1 – Prevalência das 40 espécies bacterianas presentes nas 111 amostras avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de contagem, assim como apresentado no GRÁFICO 2.

Foram também determinadas a média de contagem das quarenta espécies avaliadas (TABELA 5; GRÁFICO 2), assim como a proporção média das sondas de DNA bacteriano (GRÁFICO 3). Estas contagens foram obtidas por meio dos valores atribuídos de acordo com os níveis detectados de cada microrganismo durante a leitura dos filmes de *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (TABELA 2).

As espécies encontradas em níveis mais altos foram *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($13,14 \times 10^5$), *E. saburreum* ($5,67 \times 10^5$), *E. faecalis* ($5,38 \times 10^5$), *N. mucosa* ($4,19 \times 10^5$), *V. parvula* ($3,63 \times 10^5$), *C. gracilis* ($3,46 \times 10^5$), *T. socranskii* ($3,34 \times 10^5$), *P. endodontalis* ($2,96 \times 10^5$) e *P. gingivalis* ($2,85 \times 10^5$). A espécie *F. nucleatum* sp. *vincentii* foi detectada em nível bastante superior as demais espécies (GRÁFICO 2; TABELA 5).

TABELA 5 - Média da contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das espécies bacterianas avaliadas nas 111 amostras, nos casos assintomáticos, sintomáticos e nos casos de lesões perirradiculares $< 20\text{mm}^2$ ou $\geq 20\text{mm}^2$.

	Espécie	Nível bacteriano médio ($\times 10^5$) (n= 111)	Assintomáticos (n= 30)	Sintomáticos (n= 30)	Lesões $< 20\text{mm}^2$ (n= 40)	Lesões $\geq 20\text{mm}^2$ (n= 63)
1	<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	13,14	5,59	15,38	10,98	14,66
2	<i>E. saburreum</i>	5,67	2,20	5,35	3,72	6,99
3	<i>E. faecalis</i>	5,38	2,26	6,26	4,73	5,83
4	<i>N. mucosa</i>	4,19	1,30	5,41	3,59	4,60
5	<i>V. parvula</i>	3,63	1,08	7,87	1,00	5,46
6	<i>C. gracilis</i>	3,46	1,14	5,55	3,67	3,32
7	<i>T. socranskii</i>	3,34	0,45	7,02	2,67	3,85
8	<i>P. endodontalis</i>	2,96	0,35	0,47	0,15	4,92
9	<i>P. gingivalis</i>	2,85	0,80	4,74	1,05	4,11
10	<i>M. micros</i>	2,81	1,22	4,49	4,80	1,41
11	<i>P. nigrescens</i>	2,68	0,76	1,06	3,15	2,36
12	<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	2,64	3,80	4,75	1,07	3,74
13	<i>F. periodonticum</i>	2,06	0,86	1,26	0,94	2,85
14	<i>L. buccalis</i>	2,01	0,76	2,13	3,49	0,98
15	<i>T. forsythensis</i>	2,01	0,68*	4,87*	3,23	1,16
16	<i>S. noxia</i>	1,37	0,24	0,53	2,29	0,73
17	<i>C. ochracea</i>	1,26	1,04	1,20	0,90	1,52
18	<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	1,25	0,37	0,46	0,23	1,97
19	<i>A. odontolyticus I</i>	0,95	0,55	0,90	0,83	1,04
20	<i>P. melaninogenica</i>	0,70	0,27	0,90	0,72	0,68
21	<i>P. intermedia</i>	0,54	0,30	0,40	0,45	0,60
22	<i>S. anginosus</i>	0,54	0,19	0,88	0,50	0,56
23	<i>S. mitis</i>	0,46	0,18	0,90	0,45	0,46
24	<i>S. gordonii</i>	0,45	0,17	0,58	0,38	0,49
25	<i>G. morbillorum</i>	0,42	0,16	0,44	0,43	0,41
26	<i>T. denticola</i>	0,39	0,27	0,44	0,13	0,58
27	<i>P. acnes I</i>	0,38	0,62*	0,17*	0,58	0,24
28	<i>C. sputigena</i>	0,36	0,49	0,37	0,29	0,41
29	<i>A. naeslundii</i>	0,34	0,22	0,34	0,009*	0,57*
30	<i>S. constellatus</i>	0,34	0,05	0,20	0,27	0,39
31	<i>E. corrodens</i>	0,32	0,19	0,14	0,14	0,45
32	<i>C. showae</i>	0,32	0,26	0,33	0,19	0,41
33	<i>E. nodatum</i>	0,32	0,37	0,04	0,28	0,34
34	<i>S. intermedius</i>	0,26	0,08	0,31	0,07*	0,39*
35	<i>A. israelii</i>	0,18	0,05	0,05	0,01	0,29
36	<i>C. gingivalis</i>	0,15	0,07	0,14	0,11	0,17
37	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,12	0,04	0,07	0,17	0,08
38	<i>S. oralis</i>	0,09	0,05	0,12	0,07	0,11
39	<i>C. rectus</i>	0,08	0,06	0,06	0,07	0,08
40	<i>A. gerencseriae</i>	0,07	0,01	0,04	0,008	0,12

* espécies que apresentam diferença estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney – $p \leq 0.05$).

TABELA 6 - Média da contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença ou ausência de fístula e de câmara coronária aberta ou fechada.

	Espécie	Fístula Ausente (n= 15)	Fístula Presente (n= 15)	Câmara aberta (n= 29)	Câmara fechada (n= 29)
1	<i>F. nucleatum sp vincentii</i>	10,61	8,90	4,68*	16,24*
2	<i>E. saburreum</i>	1,75	1,90	7,56	5,51
3	<i>E. faecalis</i>	4,48*	1,70*	1,83	5,95
4	<i>N. mucosa</i>	2,50	1,25	1,28	8,14
5	<i>V. parvula</i>	8,23	0,09	0,65	4,51
6	<i>C. gracilis</i>	2,41	1,92	1,18	5,19
7	<i>T. socranskii</i>	0,49	0,75	0,48	3,88
8	<i>P. endodontalis</i>	0,36	0,41	0,36	3,55
9	<i>P. gingivalis</i>	1,85	7,38	0,61	5,08
10	<i>M. micros</i>	1,10	1,48	0,47	1,18
11	<i>P. nigrescens</i>	1,91	0,82	1,10	1,15
12	<i>F. nucleatum sp nucleatum</i>	0,97	7,36	0,63	4,36
13	<i>F. periodonticum</i>	1,36	1,01	0,56	1,62
14	<i>L. buccalis</i>	1,14	1,32	0,70	1,39
15	<i>T. forsythensis</i>	1,44	0,96	4,30	1,33
16	<i>S. noxia</i>	0,12	0,70	0,55	0,16
17	<i>C. ochracea</i>	0,74	0,67	0,70*	2,17*
18	<i>F. nucleatum sp polymorphum</i>	0,32	0,50	0,24	3,73
19	<i>A. odontolyticus I</i>	0,84	0,81	0,36	1,23
20	<i>P. melaninogenica</i>	0,72	0,45	0,43	0,74
21	<i>P. intermedia</i>	0,76	0,36	0,57	0,66
22	<i>S. anginosus</i>	1,65*	0,13*	0,51	0,28
23	<i>S. mitis</i>	0,64	0,18	0,18	0,51
24	<i>S. gordonii</i>	0,20	0,15	0,11	0,72
25	<i>G. morbillorum</i>	0,20	0,10	0,11	0,55
26	<i>T. denticola</i>	0,12	0,36	0,10	0,80
27	<i>P. acnes I</i>	0,68	0,36	0,45	0,39
28	<i>C. sputigena</i>	0,32*	0,05*	0,16	0,59
29	<i>A. naeslundii</i>	0,74	0,01	0,04	0,37
30	<i>S. constellatus</i>	0,38	0,10	0,22	0,59
31	<i>E. corrodens</i>	0,26	0,16	0,17	0,46
32	<i>C. showae</i>	0,12	0,42	0,15	0,40
33	<i>E. nodatum</i>	0,06	0,37	0,38	0,22
34	<i>S. intermedius</i>	0,08	0,08	0,05	0,45
35	<i>A. israelii</i>	0,09	0,02	0,02	0,35
36	<i>C. gingivalis</i>	0,20*	0,03*	0,08	0,14
37	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,08	0,06	0,04	0,07
38	<i>S. oralis</i>	0,05	0,08	0,02	0,12
39	<i>C. rectus</i>	0,05	0,10	0,03	0,11
40	<i>A. gerencseriae</i>	0,01	0,01	0,01	0,006

* espécies que apresentam diferença estatisticamente significativa (*Mann-Whitney test* – $p \leq 0.05$).

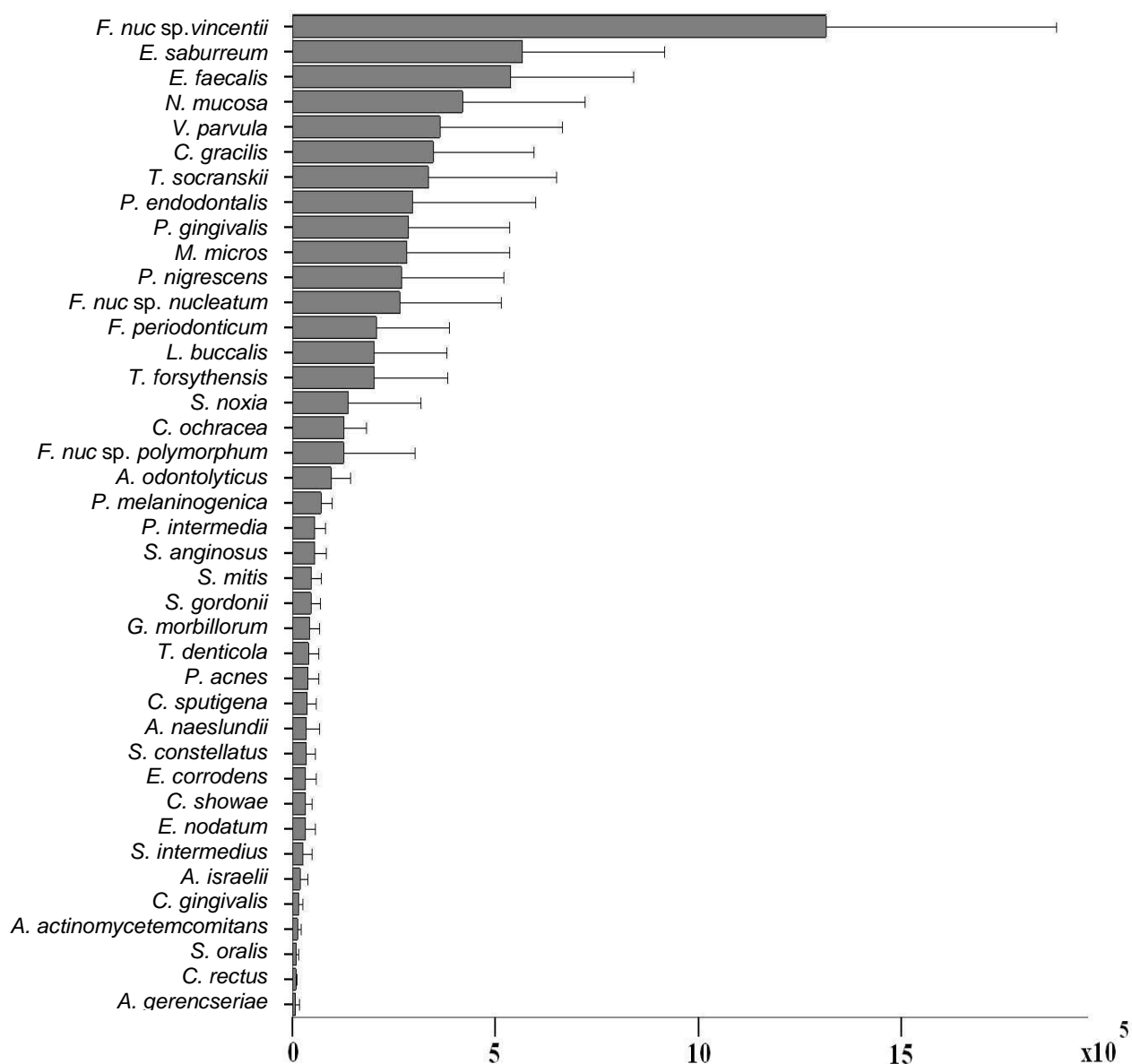


GRÁFICO 2 – Contagem (x 10⁵ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas presentes nas 111 amostras avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de contagem.

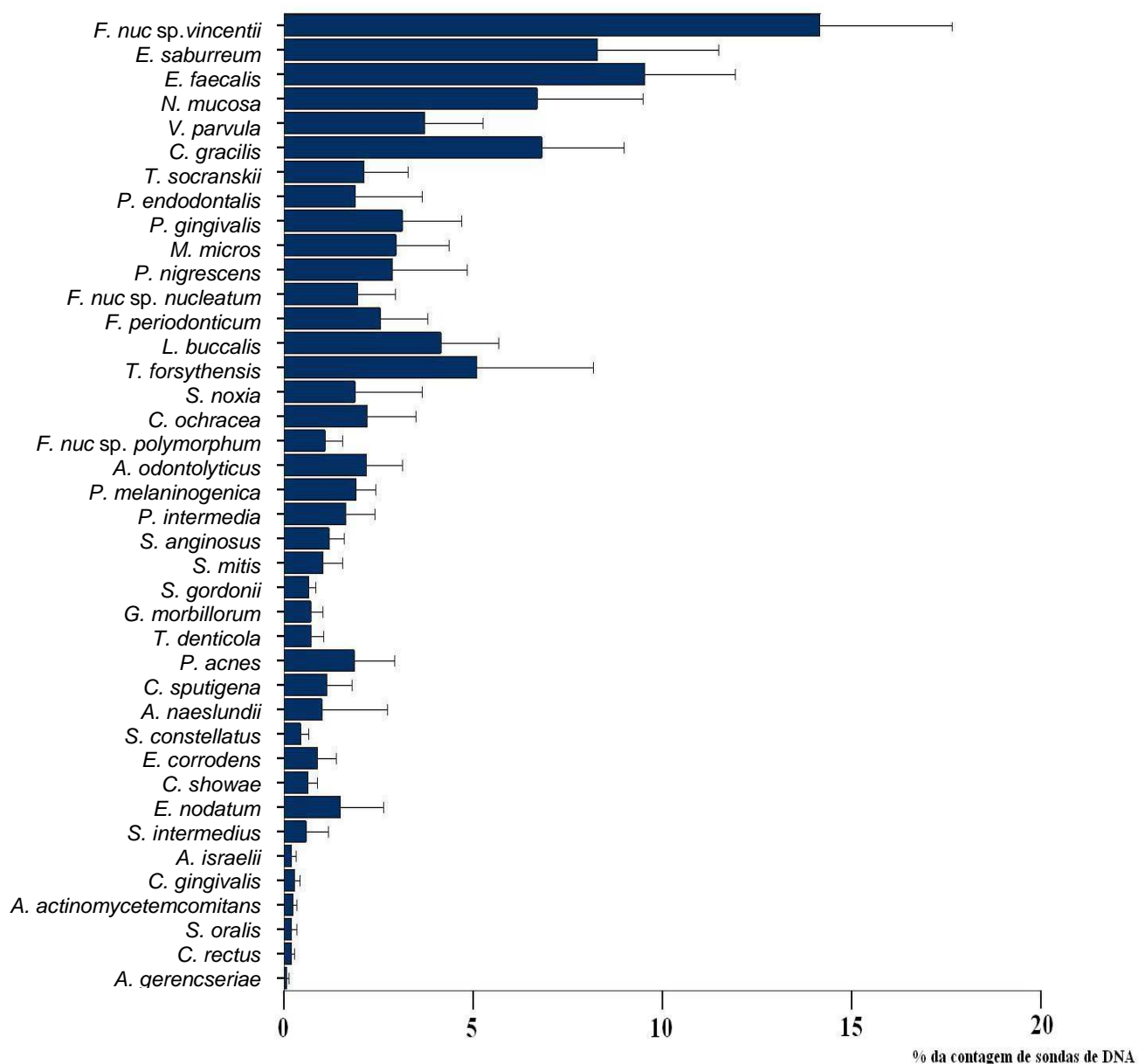


GRÁFICO 3 – Porcentagem da contagem de sondas de DNA microbiano das 40 espécies bacterianas avaliadas. As espécies estão apresentadas em ordem decrescente de acordo com a média de contagem, assim como apresentado no GRÁFICO 2.

Com o objetivo de se comparar a composição da microbiota detectada nas amostras de acordo com a presença ou ausência de dor, presença ou ausência de fístula e câmara pulpar aberta ou fechada à cavidade oral, procedeu-se da seguinte forma: o programa SPSS 11.0.1[®] (SPSS Brasil, São Paulo, SP, Brasil) selecionou, aleatoriamente, dos 81 casos com ausência de dor, trinta casos para serem comparados com os trinta casos de presença de dor. O mesmo procedimento foi feito para os 15 casos de fístula presente e para os 29 casos de câmara pulpar aberta.

Nos casos de presença dor, a média do total dos microrganismos avaliados foi de 86×10^5 células bacterianas (EPM = 24×10^5) e nos casos de ausência de dor foi de 29×10^5 células bacterianas (EPM = $8,4 \times 10^5$) (GRÁFICO 4). Esses resultados demonstram concentração bacteriana significativamente maior na presença de dor em relação à ausência de dor (teste *t*, $p < 0,05$).

O GRÁFICO 5 e a TABELA 5 apresentam as médias dos níveis das quarenta espécies bacterianas avaliadas nos casos com e sem dor. *T. forsythensis* foi encontrada em concentrações significativamente mais altas na presença de dor e *P. acnes* nos casos de ausência de dor ($p < 0,05$).

No geral, a maioria das espécies, individualmente, mostrou contagens mais elevadas nos casos de dor. Nos casos assintomáticos, as espécies detectadas em níveis mais altos foram: *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($5,59 \times 10^5$), *F. nucleatum* sp. *nucleatum* ($3,80 \times 10^5$), *E. faecalis* ($2,26 \times 10^5$), *E. saburreum* ($2,20 \times 10^5$), *N. mucosa* ($1,30 \times 10^5$), *C. gracilis* ($1,14 \times 10^5$) e *V. parvula* ($1,08 \times 10^5$). Nos casos sintomáticos foram: *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($15,38 \times 10^5$), *V. parvula* ($7,87 \times 10^5$),

T. socranskii ($7,02 \times 10^5$), *E. faecalis* ($6,26 \times 10^5$), *C. gracilis* ($5,55 \times 10^5$), *N. mucosa* ($5,41 \times 10^5$) e *E. saburreum* ($5,35 \times 10^5$).

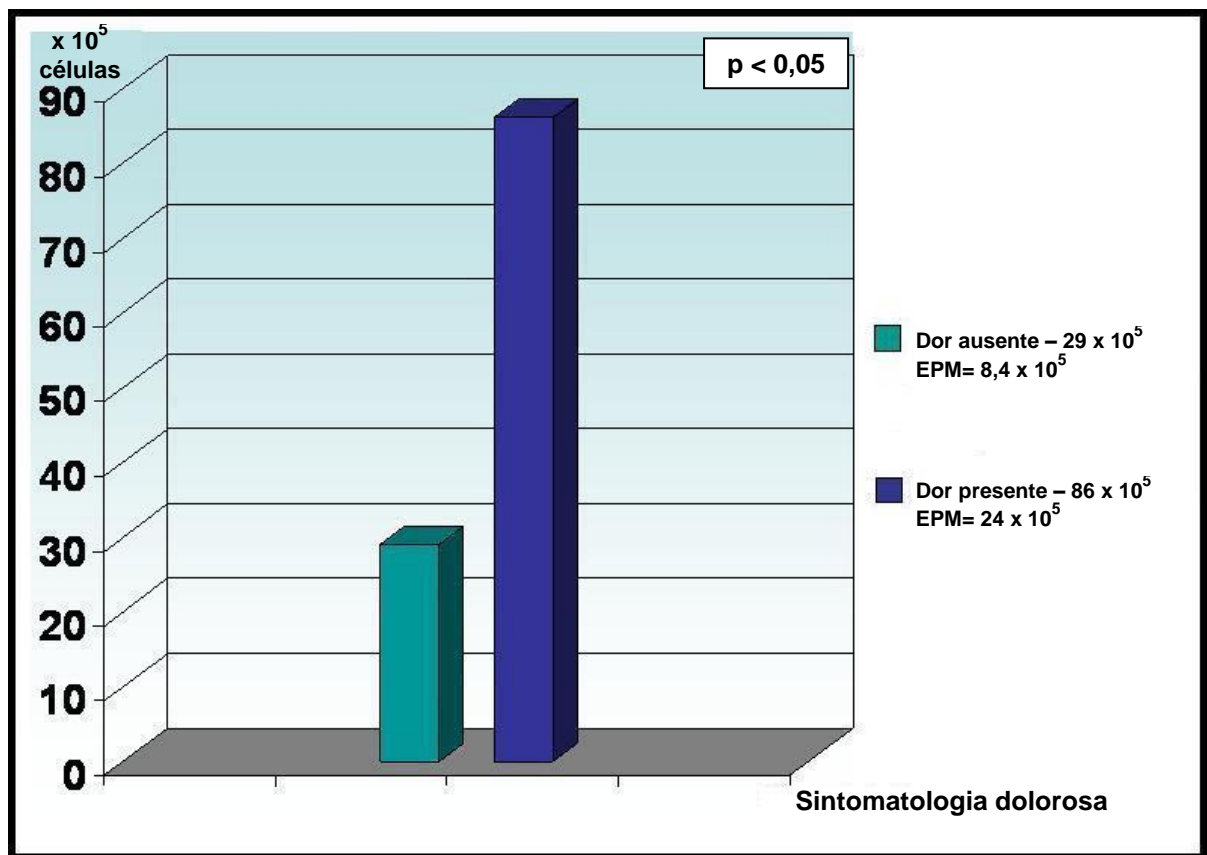


GRÁFICO 4 - Média total dos níveis ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de ausência e presença de dor ($p < 0,05$; teste *t*).

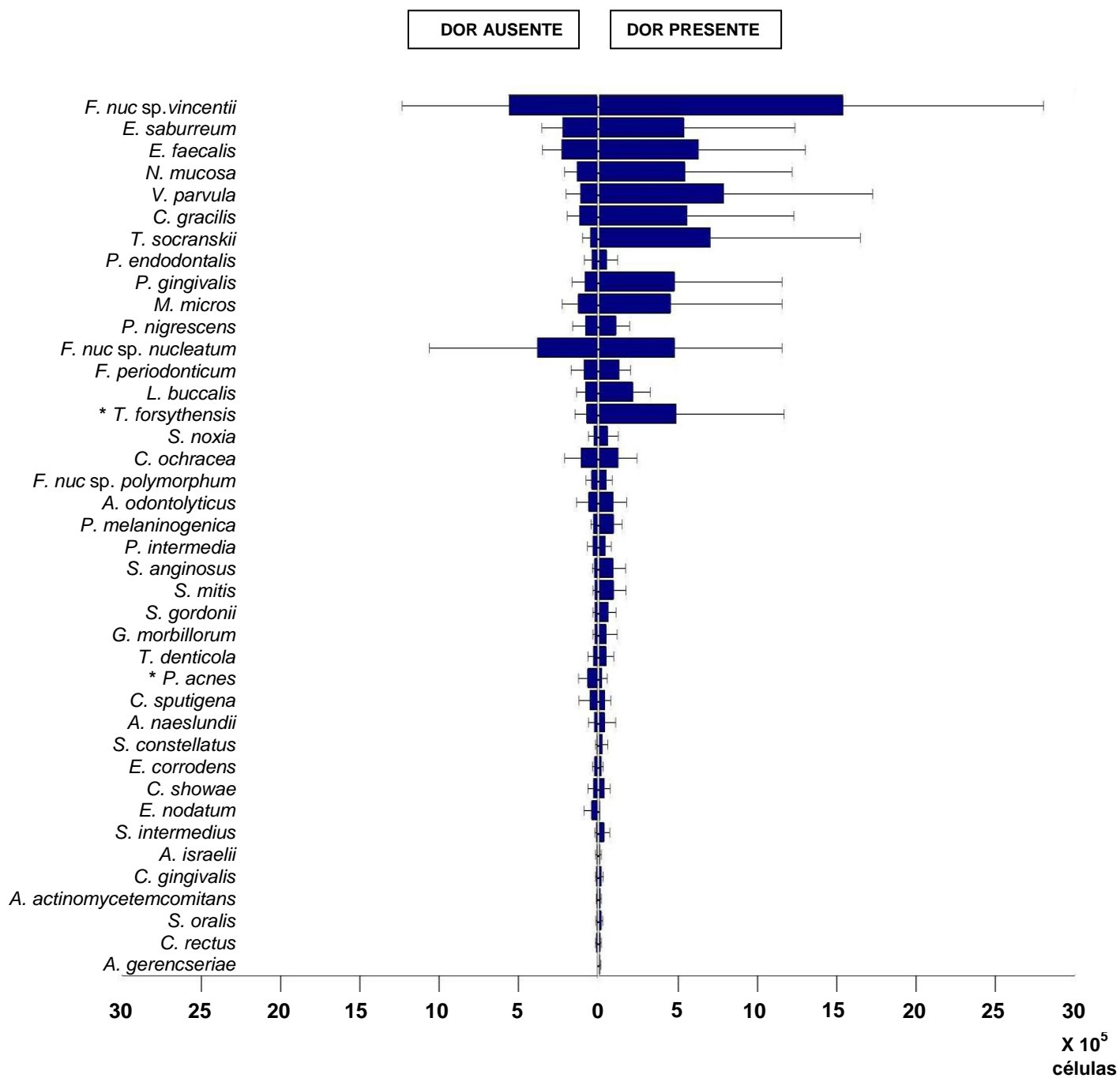


GRÁFICO 5 – Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença e ausência de dor (* $p < 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

Nos casos de presença de fístula, a média total de microrganismos foi de 44×10^5 células bacterianas (EPM= 21×10^5) e nos casos de ausência de fístula foi de 50×10^5 células bacterianas (EPM= 13×10^5) (GRÁFICO 6). Apesar de, nos casos de fístula ausente, a concentração bacteriana observada ter sido maior, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa por meio do teste *t* ($p > 0,05$).

Nos casos de ausência de fístula, as espécies detectadas em maiores concentrações foram: *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($10,61 \times 10^5$), *V. parvula* ($8,23 \times 10^5$), *E. faecalis* ($4,48 \times 10^5$), *N. mucosa* ($2,50 \times 10^5$), *C. gracilis* ($2,41 \times 10^5$) e *E. saburreum* ($1,75 \times 10^5$). Já nos casos de presença de fístula foram: *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($8,90 \times 10^5$), *P. gingivalis* ($7,38 \times 10^5$), *F. nucleatum* sp. *nucleatum* ($7,36 \times 10^5$), *C. gracilis* ($1,92 \times 10^5$), *E. saburreum* ($1,90 \times 10^5$) e *E. faecalis* ($1,70 \times 10^5$). Foi verificada diferença estatística ($p < 0,05$) para as espécies *E. faecalis*, *S. anginosus*, *C. sputigena* e *C. gingivalis*, que mostraram níveis mais altos na ausência de fístula.

(GRÁFICO 7; TABELA 6).

$\times 10^5$
células

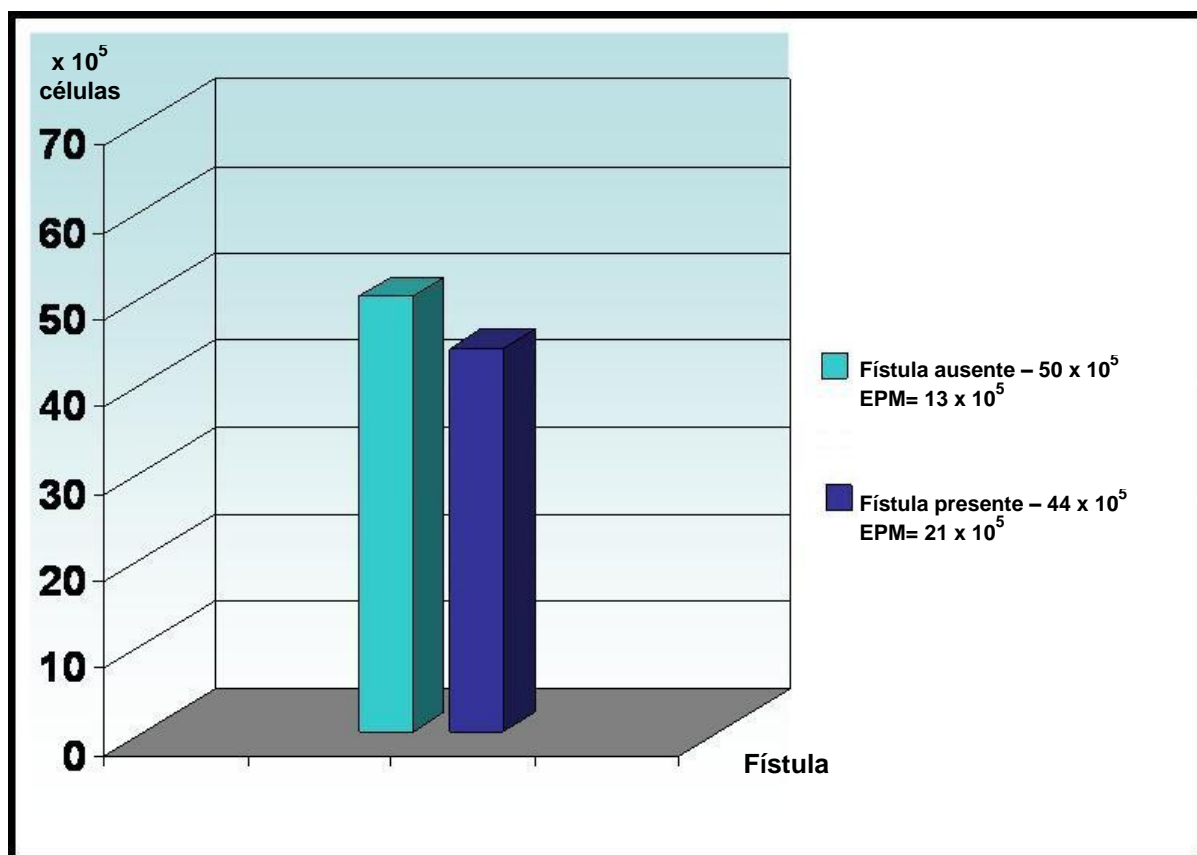


GRÁFICO 6 - Média total dos níveis ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de ausência e presença de fístula ($p > 0,05$; teste t).

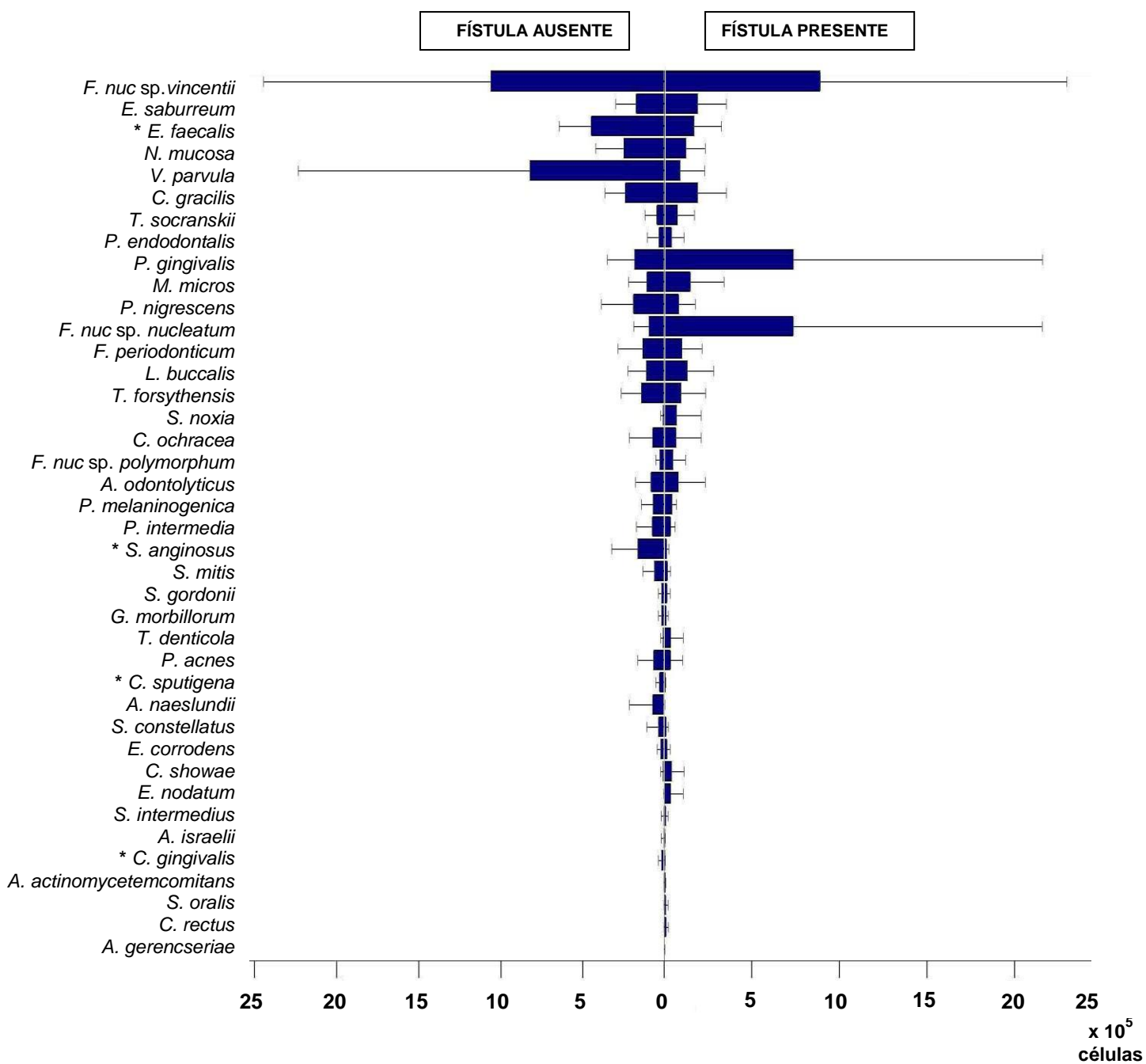


GRÁFICO 7 – Contagem ($\times 10^5$ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de presença e ausência de fístula (* $p < 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

Quando foi analisada a influência do estado da câmara pulpar, ou seja, se a cavidade pulpar apresentava ou não comunicação com o meio oral, a média dos níveis microbianos nos casos de câmara pulpar fechada foi de 84×10^5 células bacterianas (EPM = 29×10^5), superior, apesar de não significativo ($p > 0,05$; teste *t*), aos observados nos casos de câmara pulpar aberta (32×10^5 células bacterianas; EPM = $7,4 \times 10^5$) (GRÁFICO 8).

Nos casos de câmara aberta as espécies detectadas em níveis mais altos foram *E. saburreum* ($7,56 \times 10^5$), *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($4,68 \times 10^5$), *T. forsythensis* ($4,30 \times 10^5$), *E. faecalis* ($1,83 \times 10^5$), *N. mucosa* ($1,28 \times 10^5$), *C. gracilis* ($1,18 \times 10^5$) e *P. nigrescens* ($1,10 \times 10^5$) e nos casos de câmara fechada foram *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($16,93 \times 10^5$), *N. mucosa* ($8,14 \times 10^5$), *E. faecalis* ($5,95 \times 10^5$), *E. saburreum* ($5,51 \times 10^5$), *C. gracilis* ($5,19 \times 10^5$) e *P. gingivalis* ($5,08 \times 10^5$). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para as espécies bacterianas *F. nucleatum* sp. *vincentii* e *C. ochracea* que estavam em níveis mais altos nos casos de câmara pulpar fechada (GRÁFICO 9; TABELA 6).

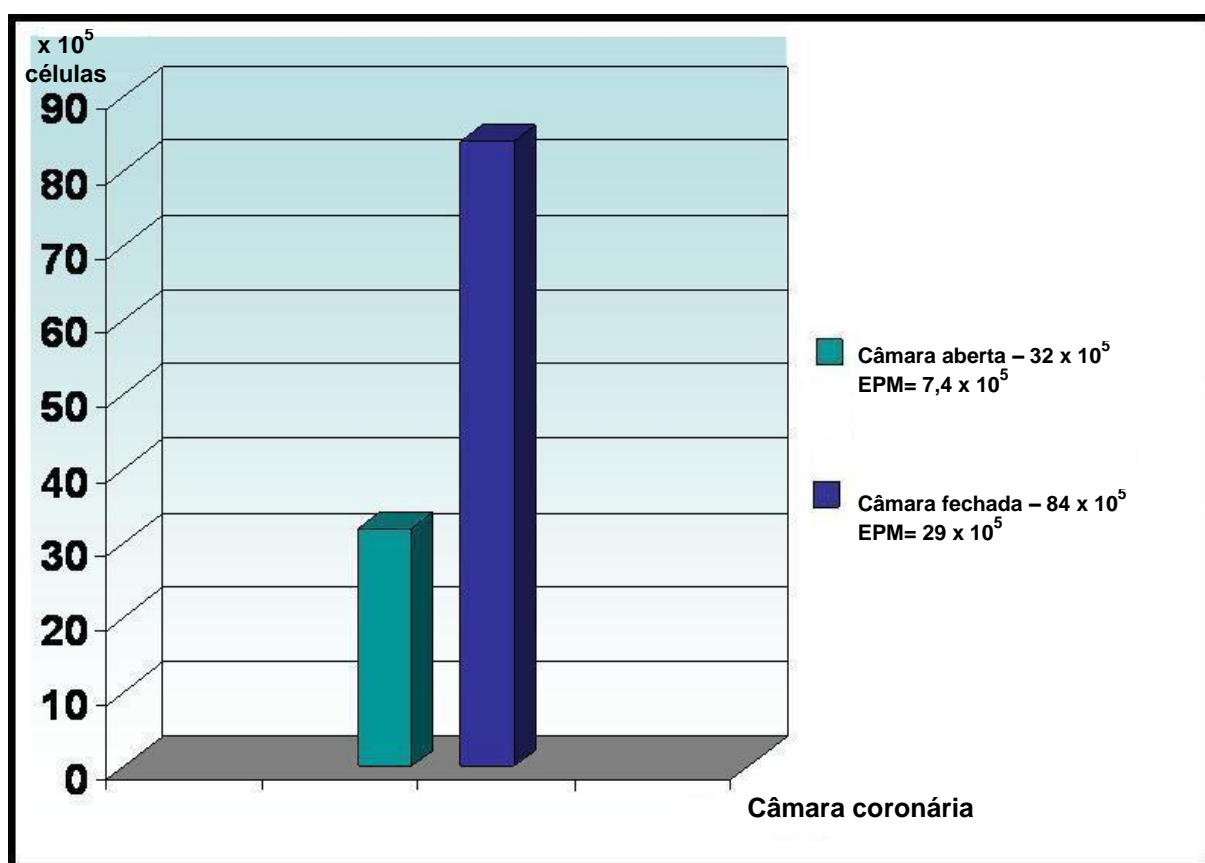


GRÁFICO 8 - Média total dos níveis (x 10⁵) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de câmara pulpar aberta e câmara pulpar fechada ($p > 0,05$; teste t)

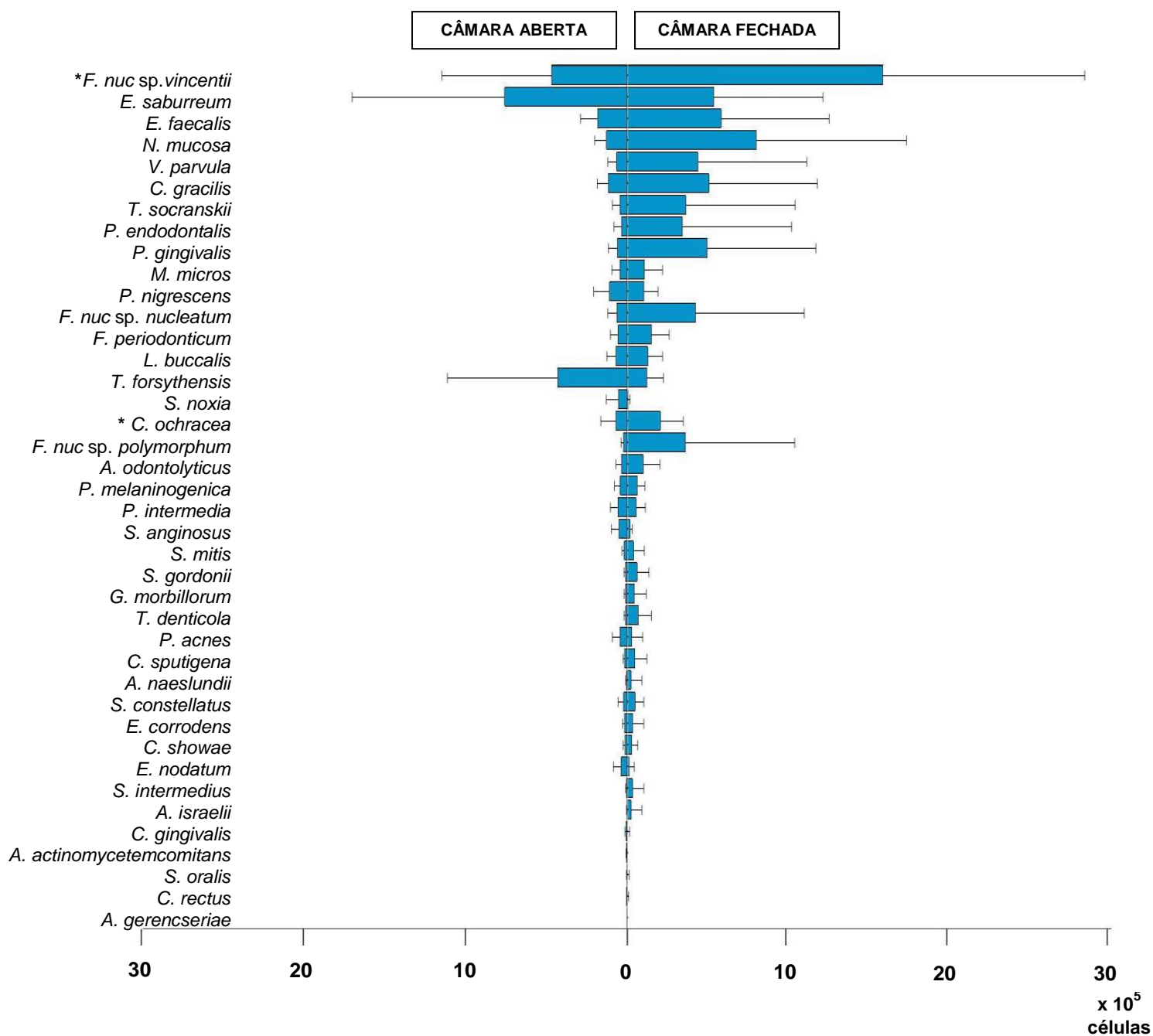


GRÁFICO 9 – Contagem (x 10^5 células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de câmara pulpar aberta e câmara pulpar fechada (* $p < 0,05$; teste *Mann-Whitney*).

Com o objetivo de analisar a relação da microbiota com o tamanho da lesão perirradicular, os casos onde as lesões estavam presentes foram subdivididos em dois grupos distintos⁶: grupo de lesões menores que 20mm² e grupo de lesões maiores ou iguais a 20mm². Dos 103 casos onde estas lesões estavam presentes, 40 foram classificadas como < 20mm² e 63 como ≥ 20mm². Foi detectada uma maior concentração bacteriana nos casos de lesões ≥ 20mm² (79 x 10⁵ células bacterianas; EPM = 17 x 10⁵) do que nos casos de lesões < 20mm² (57 x 10⁵ células bacterianas; EPM = 16 x 10⁵), apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa (p > 0,05; teste t) (GRÁFICO 10).

Nos casos de lesões < 20mm² as espécies encontradas em maiores concentrações foram *F. nucleatum* sp. *vincentii* (10,98 x 10⁵), *M. micros* (4,80 x 10⁵), *E. faecalis* (4,73 x 10⁵), *E. saburreum* (3,72 x 10⁵), *C. gracilis* (3,67 x 10⁵), *N. mucosa* (3,59 x 10⁵) e *L. buccalis* (3,49 x 10⁵). Nos casos de lesões ≥ 20mm² as espécies encontradas em maiores concentrações foram *F. nucleatum* sp. *vincentii* (14,66 x 10⁵), *E. saburreum* (6,99 x 10⁵), *E. faecalis* (5,83 x 10⁵), *V. parvula* (5,46 x 10⁵), *P. endodontalis* (4,92 x 10⁵), *N. mucosa* (4,60 x 10⁵) e *P. gingivalis* (4,11 x 10⁵). Foi verificada diferença estatisticamente significativa apenas para as espécies *S. intermedius* e *A. naeslundii*, que mostraram níveis mais altos no grupo das lesões ≥ 20mm² (p < 0,05) (GRÁFICO 11; TABELA 5).

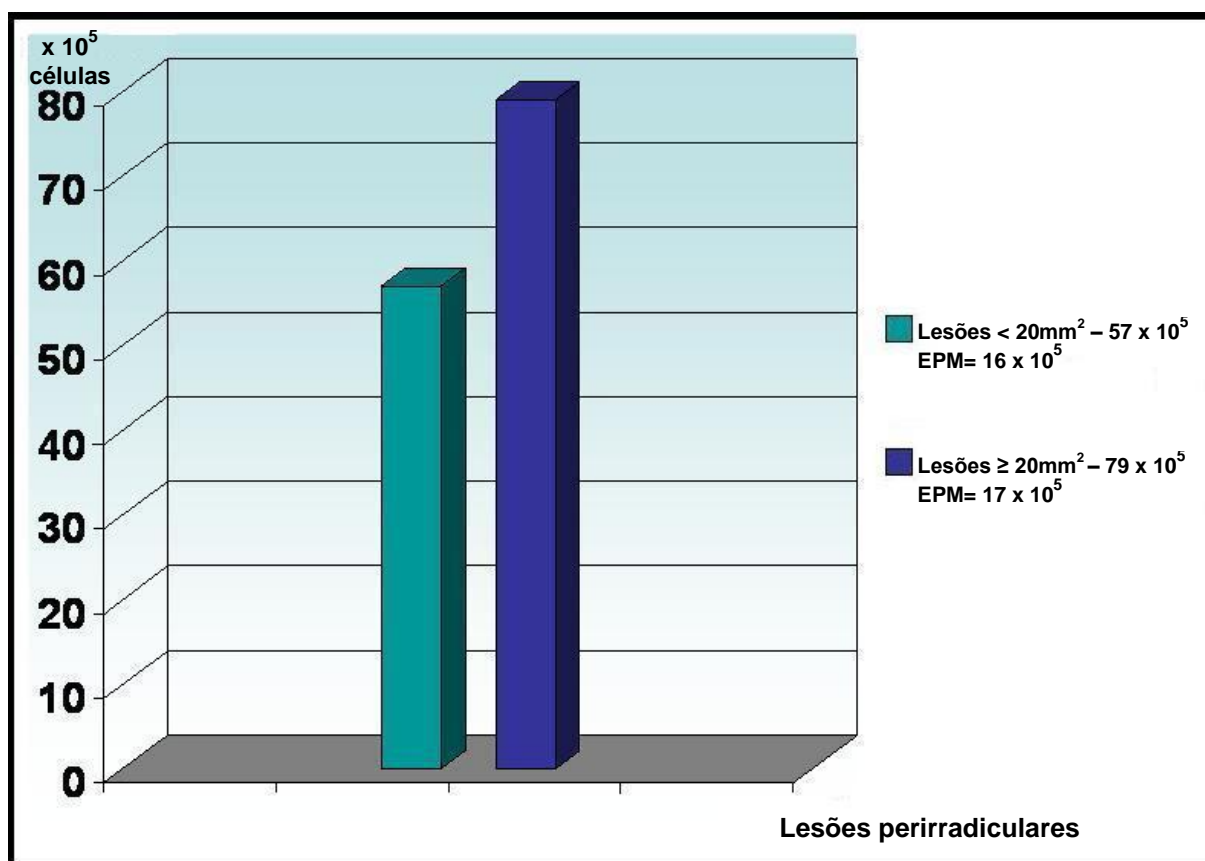


GRÁFICO 10 – Média total do níveis (x 10⁵) das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de lesões < 20mm² e lesões ≥ 20mm². (p > 0,05; teste t).

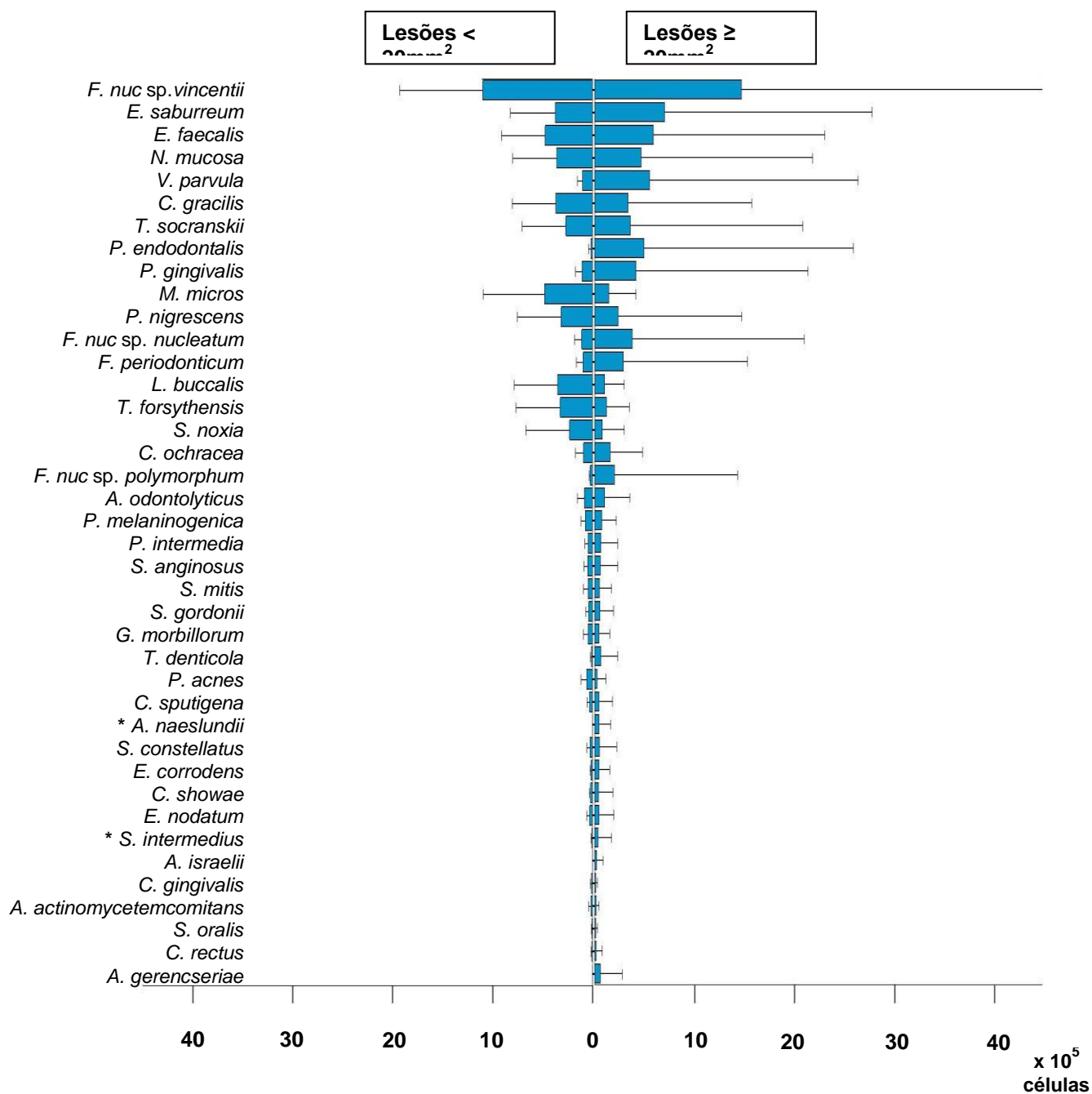


GRÁFICO 11 – Contagem (x 10⁵ células bacterianas) dos níveis médios das 40 espécies bacterianas avaliadas nos casos de lesões < 20mm² e lesões ≥ 20mm² (* p < 0,05; teste *Mann-Whitney*).

Foi realizada uma outra forma de análise aonde as quarenta espécies bacterianas foram agrupadas por gênero (TABELA 7). Os gêneros que apresentavam mais de três espécies foram agrupados separadamente. Já os gêneros que apresentavam apenas duas ou mesmo uma única espécie bacteriana, foram reunidos em dois grupos de acordo com a sua maior ou menor patogenicidade, formando um grupo das espécies mais agressivas (grupo patógenos) e outro das espécies menos agressivas (grupo outros).

TABELA 7- Divisão das 40 espécies bacterianas em gêneros ou grupos.

Gêneros	Bactérias	
<i>Prevotella</i>	<i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. melaninogenica</i>	
<i>Fusobacterium</i>	<i>F. periodonticum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>vincentii</i>	
<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> <i>A. gerencseriae</i> <i>A. naeslundii</i> <i>genospecies I</i> <i>A. odontolyticus</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>C. rectus</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. showae</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>S. constellatus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i>	<i>S. oralis</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. anginosus</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i> <i>C. ochracea</i> <i>C. sputigena</i>	
patógenos	<i>T. denticola</i> <i>T. socranskii</i> <i>T. forsythensis</i> <i>M. micros</i>	<i>S. noxia</i> <i>P. acnes</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. endodontalis</i>
outros	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>N. mucosa</i> <i>E. corrodens</i> <i>G. morbillorum</i>	<i>V. parvula</i> <i>E. saburreum</i> <i>E. nodatum</i> <i>L. buccalis</i>

	<i>E. faecalis</i>
--	--------------------

Os grupos que mostraram as médias de contagem mais altas foram: outros (22,03 x 10⁵), *Fusobacterium* (19,12 x 10⁵) e patógenos (15,99 x 10⁵) (GRÁFICO 12).

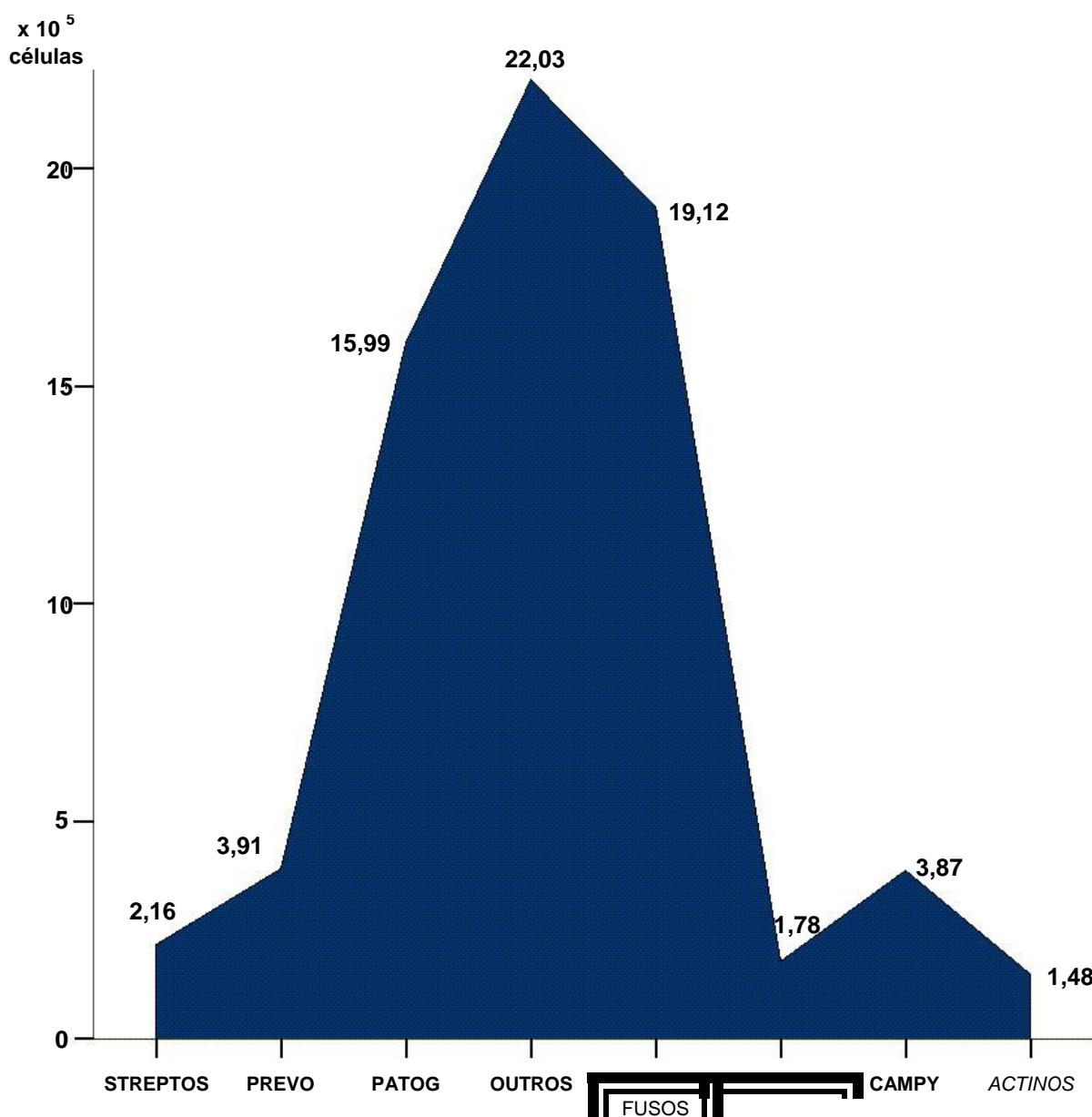


GRÁFICO 12 – Níveis médios (x 10⁵ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas agrupadas por gênero nas 111 amostras. (STREPTOS - Streptococcus; PREVO - Prevotella; PATOG – patógenos; FUSOS – *Fusobacterium*; CAPNOS - *Capnocytophaga*; CAMPY – *Campylobacter*;

ACTINOS – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7).

Foi realizada a verificação do nível médio bacteriano destes gêneros/grupos nos diferentes aspectos clínicos analisados.

Quando presença ou ausência de dor foi analisada, todos os grupos bacterianos estavam em níveis maiores nos casos de dor presente, porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Tanto nos casos de presença quanto nos casos de ausência de dor os gêneros/grupos com maiores concentrações bacterianas foram outros, patógenos e *Fusobacterium* (GRÁFICO

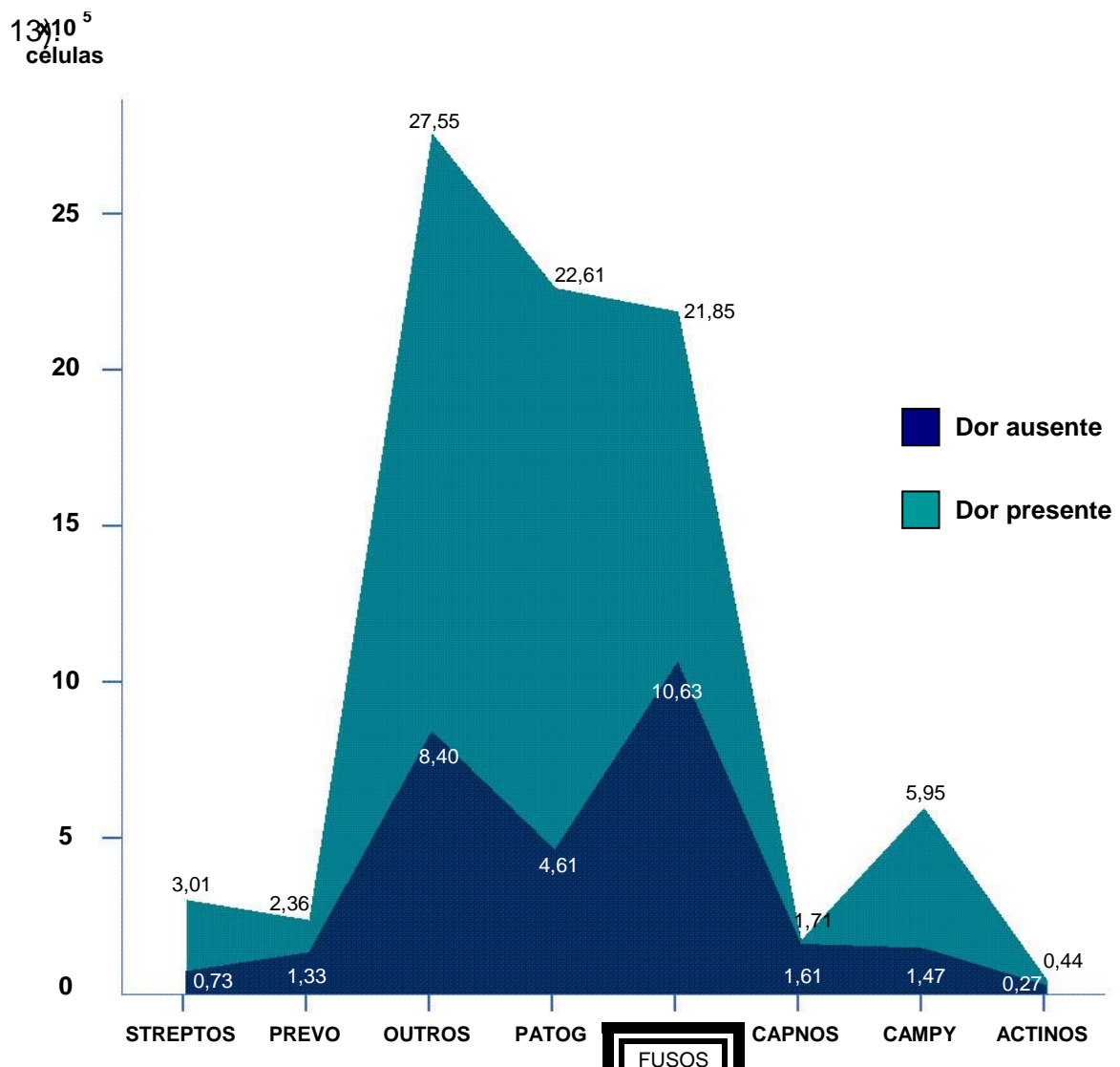


GRÁFICO 13 – Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas, agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com ausência e presença de dor (STREPTOS- *Streptococcus*; PREVO- *Prevotella*; PATOG – patógenos; FUSOS – *Fusobacterium*; CAPNOS - *Capnocytophaga*; CAMPY – *Campylobacter*; ACTINOS – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam dor ausente e valores numéricos pretos dor presente. (* $p < 0,05$, teste de *Mann-Whitney*)

Já quando a presença ou ausência de fístula foi analisada, os gêneros *Streptococcus* ($p < 0,05$) e *Capnocytophaga* ($p < 0,01$) demonstraram diferença estatisticamente significativa, estando presentes em maior quantidade nos casos de ausência de fístula (GRÁFICO 14). Também nos casos de fístula ausente o grupo outros foi o que apresentou nível médio bacteriano mais alto entre os gêneros/grupos. Entretanto, nos casos de fístula presente o gênero que apresentou nível médio bacteriano mais alto foi o *Fusobacterium*.

$\times 10^5$
células

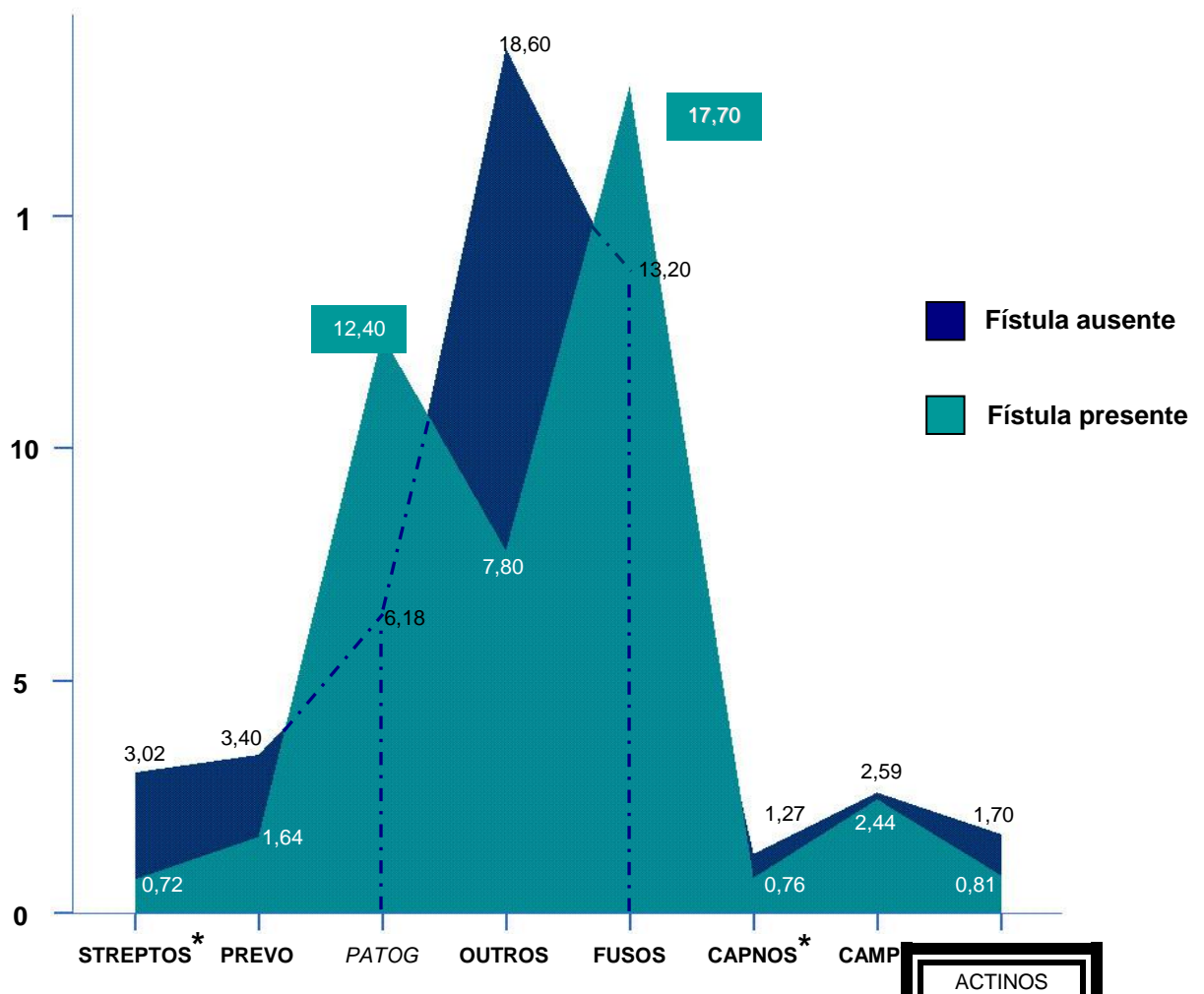


GRÁFICO 14– Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas, agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com ausência ou presença de fístula (STREPTOS- *Streptococcus*; PREVO- *Prevotella*; PATOG – patógenos; FUSOS – *Fusobacterium*; CAPNOS - *Capnocytophaga*; CAMPY – *Campylobacter*; ACTINOS – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam fístula presente e valores numéricos pretos fístula ausente (* $p < 0,05$, teste *Mann-Whitney*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros/grupos bacterianos nos casos da câmara pulpar estar aberta ou fechada à cavidade oral ($p > 0,05$). Os grupos outros e patógenos foram os que apresentaram níveis médios bacterianos mais altos nos casos de câmara pulpar aberta e o grupo outros e *Fusobacterium* nos casos de câmara pulpar fechada. É importante ressaltar que os níveis de todos os grupos foram maiores nos casos de câmara fechada (GRÁFICO

$\times 10^5$
células

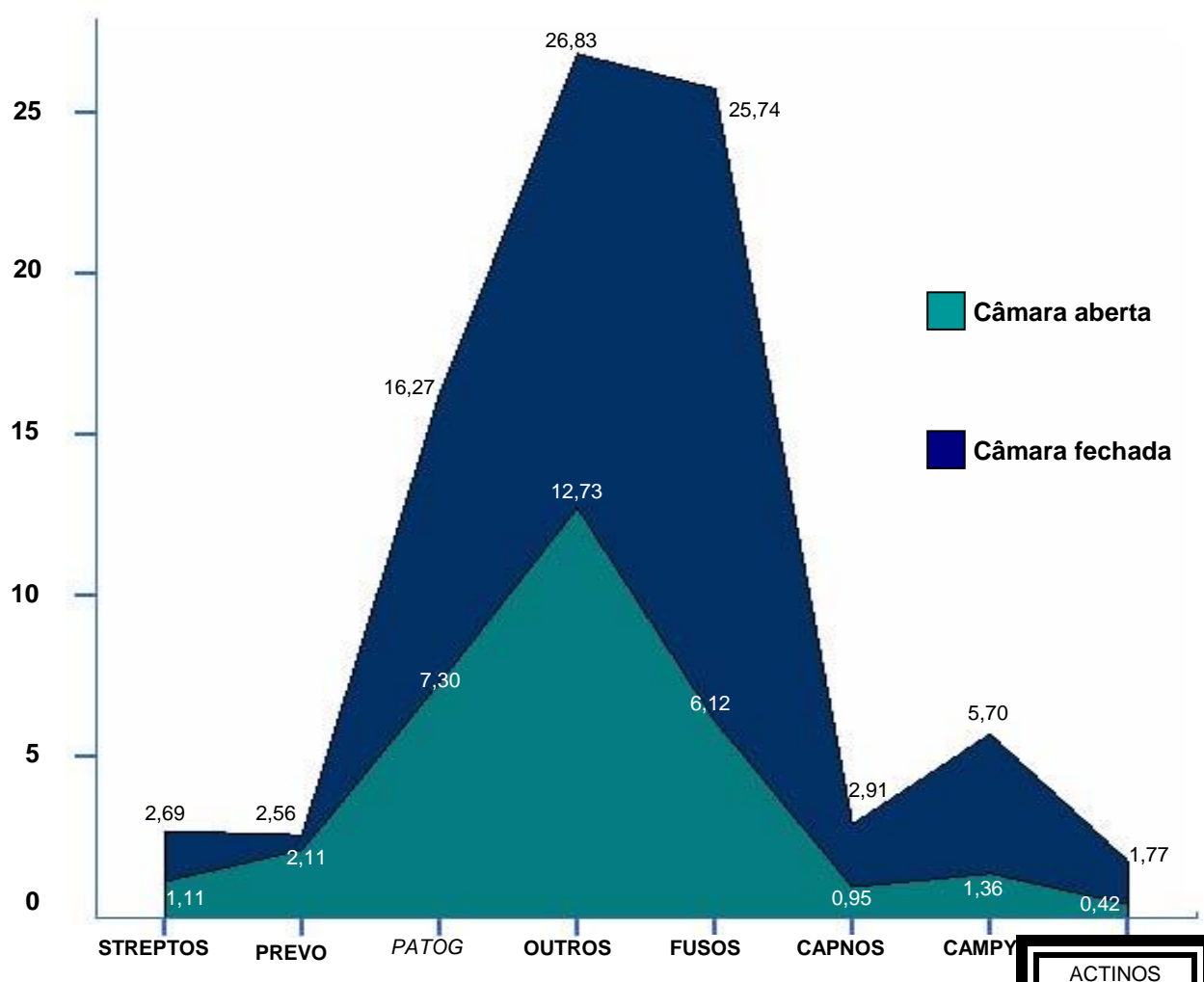


GRÁFICO 15 – Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com câmara pulpar aberta ou câmara pulpar fechada (STREPTOS- *Streptococcus*; PREVO- *Prevotella*; PATOG – patógenos; FUSOS – *Fusobacterium*; CAPNOS - *Capnocytophaga*; CAMPY – *Campylobacter*; ACTINOS – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam câmara aberta e valores numéricos pretos câmara fechada (* $p < 0,05$, teste *Mann-Whitney*).

Quanto a diferença entre os gêneros de acordo com o grupo que apresentou lesões periapicais $< 20\text{mm}^2$ ou $\geq 20\text{mm}^2$, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Os grupos outros e patógenos foram os que apresentaram níveis médios bacterianos mais altos nos casos de lesões $< 20\text{mm}^2$ e o grupo outros e o gênero *Fusobacterium* nos casos de lesões $\geq 20\text{mm}^2$.

$\times 10^5$
células

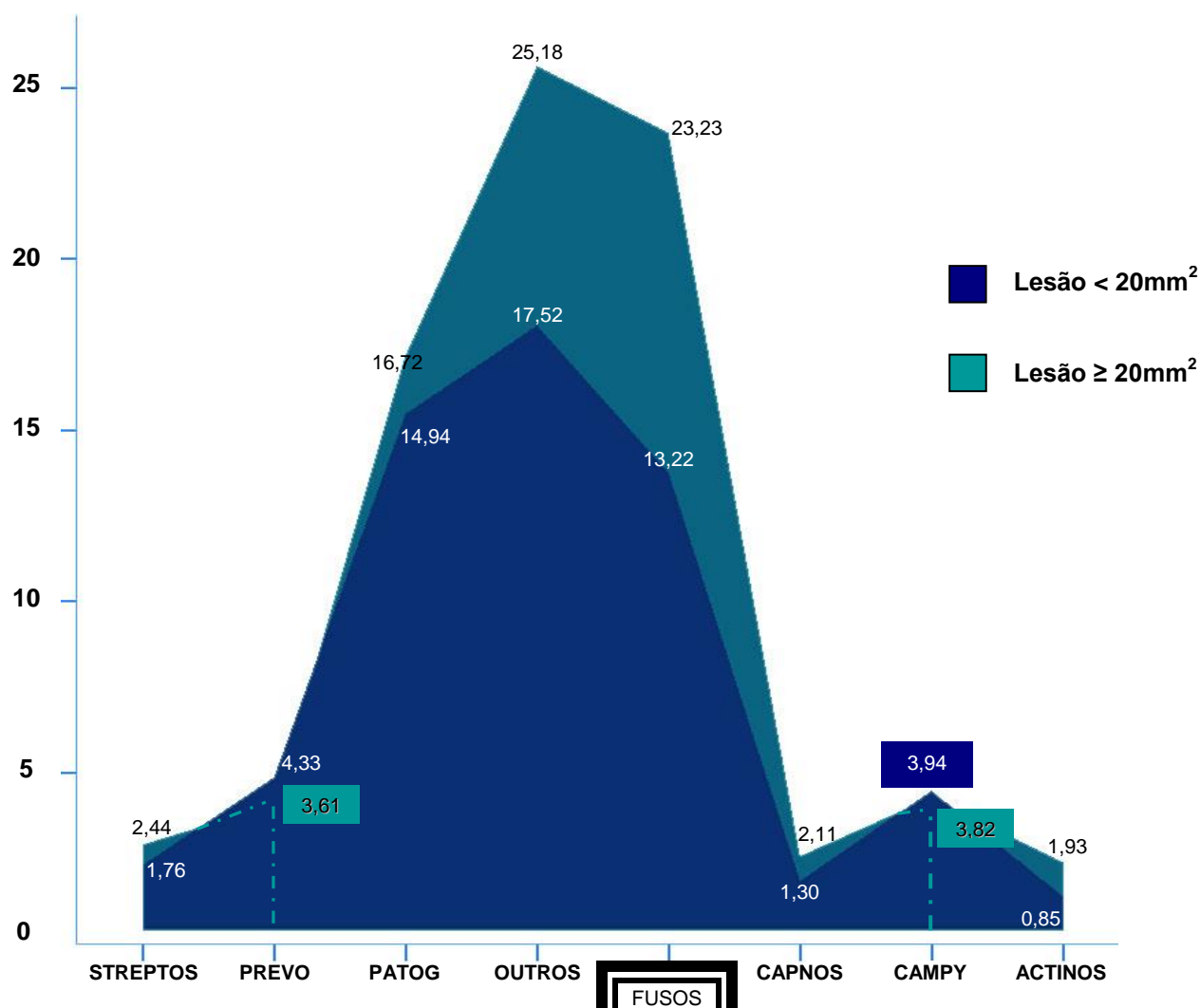


GRÁFICO 16– Níveis médios ($\times 10^5$ células bacterianas) das 40 espécies avaliadas, agrupadas por gêneros presentes nas amostras de canais radiculares em dentes com lesões $< 20\text{mm}^2$ e lesões $\geq 20\text{mm}^2$ (STREPTOS- *Streptococcus*; PREVO- *Prevotella*; PATOG – patógenos; FUSOS – *Fusobacterium*; CAPNOS - *Capnocytophaga*; CAMPY – *Campylobacter*; ACTINOS – *Actinomyces* – grupos bacterianos descritos na TABELA 7). Valores numéricos brancos designam lesões $< 20\text{mm}^2$ e valores numéricos pretos lesões $\geq 20\text{mm}^2$. (* $p < 0,05$, teste *Mann-Whitney*).

Em outra análise, as espécies bacterianas avaliadas foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (1998, 2002), como demonstrado na TABELA 8. As espécies bacterianas que não se enquadraram em nenhum dos complexos foram agrupadas em dois grupos chamados outros e outros 1. O grupo outros reúne *T. socranskii*, *S. noxia*, *P. acnes*,

P. endodontalis, *S. anginosus*, *G. morbillorum* e *E. saburreum*. O grupo outros 1 abrange três espécies que foram encontradas em prevalências elevadas: *N. mucosa*, *L. buccalis* e *E. faecalis*.

TABELA 8- Divisão das 40 espécies bacterianas nos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.*^{60, 59} (1998, 2002).

Complexos	Bactérias	
vermelho	<i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythensis</i> <i>T. denticola</i>	
laranja	<i>F. periodonticum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i> <i>F. nucleatum</i> sp. <i>vincentii</i> <i>E. nodatum</i> <i>S. constellatus</i>	<i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>M. micros</i> <i>C. showae</i> <i>C. rectus</i> <i>C. gracilis</i>
* amarelo	<i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i>	<i>S. oralis</i> <i>S. intermedius</i>
verde	<i>C. gingivalis</i> <i>C. ochracea</i> <i>C. sputigena</i>	<i>E. corrodens</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i>
roxo	<i>A. odontolyticus</i> <i>V. parvula</i>	
** grupo azul	<i>A. israelii</i> <i>A. gerencseriae</i> <i>A. naeslundii</i> <i>genospecies I</i>	
outros	<i>T. socranskii</i> <i>S. noxia</i> <i>P. acnes</i> <i>P. endodontalis</i> ***	<i>S. anginosus</i> <i>G. morbillorum</i> <i>E. saburreum</i>
outros 1	<i>N. mucosa</i> <i>L. buccalis</i> <i>E. faecalis</i> ***	

* A espécie *S. sanguinis* não foi incluída no grupo.

** A espécie *A. naeslundii* *genospecies II* não foi incluída no grupo.

*** As espécies *E. faecalis* e *P. endodontalis* foram as que substituíram as espécies *S. sanguinis* e *A. naeslundii* *genospecies II*.

O complexo laranja apresentou a proporção mais alta (42,15%) seguido pelos grupos outros (20,85%) e outros 1 (16,47%). O complexo vermelho foi detectado em

proporção mais alta do que os complexos amarelo, verde, roxo e azul (GRÁFICO 17).

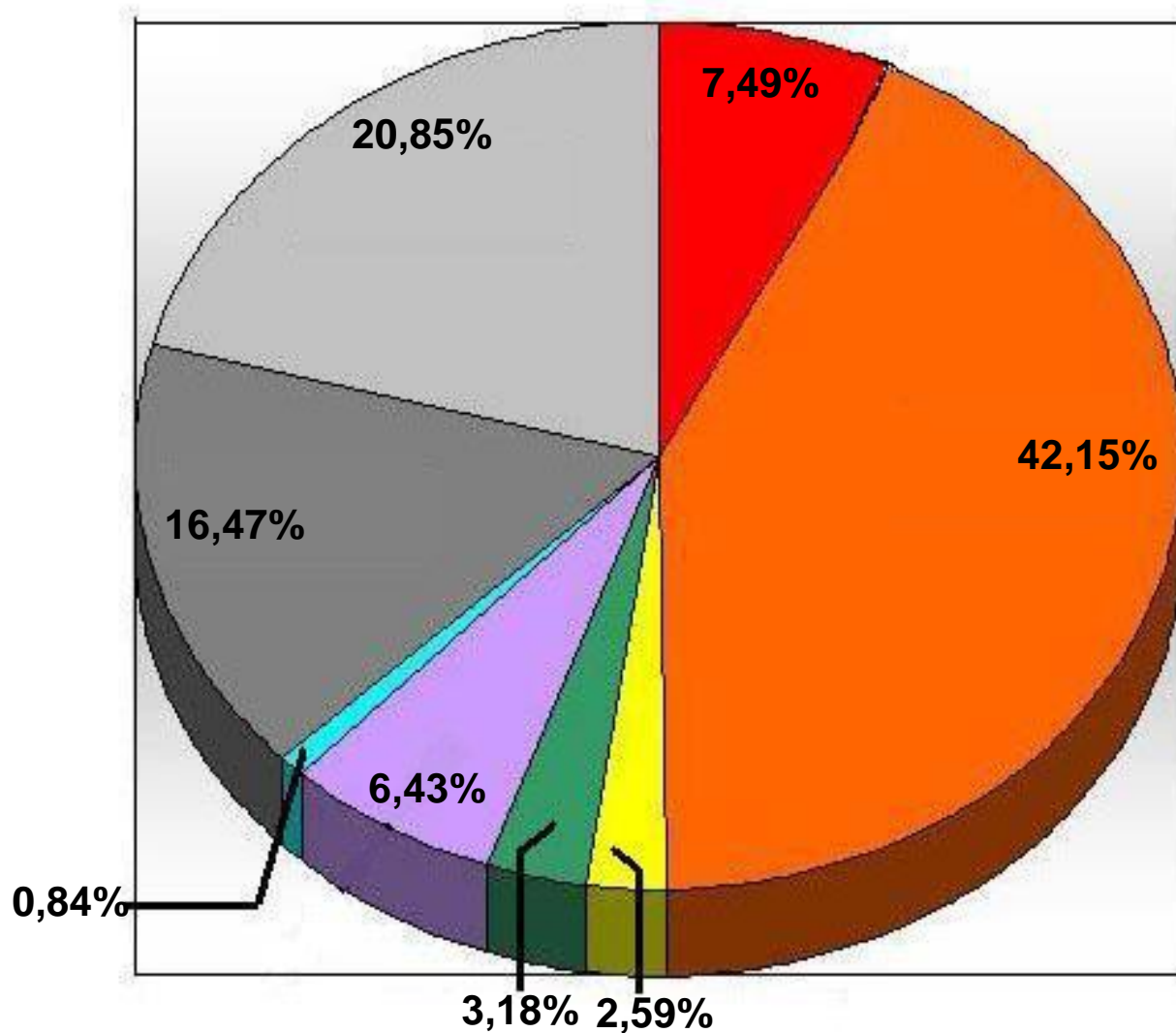


GRÁFICO 17– Média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY *et al.* (1998, 2002)^{60, 59} presentes nas 111 amostras avaliadas (grupos bacterianos descritos na TABELA 8).

Complexos Microbianos vermelho laranja amarelo verde roxo grupo azul outros 1 outros

Foram realizadas comparações entre as proporções dos diferentes complexos bacterianos dentro das condições clínicas e radiográficas avaliadas.

Quanto à presença ou ausência de dor pode-se verificar que o complexo vermelho apresentou proporção estatisticamente maior na presença de dor ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa para os demais grupos (GRÁFICO 18). Nas duas situações clínicas as maiores concentrações em nível médio bacteriano foram detectadas para o complexo laranja e os grupos outros e outros 1.

Já em relação à presença de fístula, os complexos verde ($p < 0,01$) e amarelo ($p < 0,01$) apresentaram diferença estatisticamente significativa, estando presentes em proporções maiores na ausência de fístula. Nos casos de fístula presente as maiores proporções se dão nos complexos laranja e vermelho, e quando havia ausência de fístula as maiores proporções foram observadas para os complexos laranja e roxo (GRÁFICO 19).

Com relação à câmara coronária apresentar-se aberta ou fechada, não houve diferença estatisticamente significante entre nenhum grupo bacteriano ($p > 0,05$). Nos casos de câmara coronária aberta, o complexo amarelo e o grupo outros apresentaram proporções mais altas, seguidos do complexo vermelho. Nos casos de câmara coronária fechada, os complexos mais prevalentes foram o laranja, outros 1 e outros (GRÁFICO 20).

Nos casos de lesões $< \text{ou} \geq 20 \text{ mm}^2$ apenas o grupo azul (*Actinomyces*) demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), apresentando proporções mais altas nos casos de lesões $\geq 20 \text{ mm}^2$; os complexos vermelho e amarelo foram detectados em concentrações praticamente semelhantes em ambos os casos. Nos casos de lesões $\geq 20 \text{ mm}^2$ o complexo laranja e o grupo outros

apresentaram maiores proporções e nos casos de lesões $< 20 \text{ mm}^2$ o complexo laranja e o grupo outros 1 estavam em maiores proporções (GRÁFICO 21).

DISCUSSÃO

6- Discussão:

Apesar de, teoricamente, qualquer uma das inúmeras bactérias presentes na cavidade oral possa colonizar o sistema de canais radiculares, nem todas são capazes de tal feito, pois existem inúmeros fatores que podem influenciar este processo, como viabilidade de nutrientes, pH, tensão de O₂ e associação entre os microrganismos^{65, 66, 67}. Além disso, a simples presença de uma determinada espécie bacteriana em um canal radicular não é suficiente para considerá-la um patógeno endodôntico. Esta bactéria pode estar presente apenas como um microrganismo oportunista, não sendo necessariamente, a responsável pela origem do processo patológico⁴³. Após uma vasta avaliação dos estudos sobre microbiologia endodôntica verifica-se que a literatura ainda é controversa e que, até o momento, nenhuma espécie bacteriana está relacionada de forma conclusiva a uma determinada alteração de origem endodôntica.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias, utilizando a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, e relacionar as espécies ou grupo de espécies detectadas com os sinais e sintomas clínicos apresentados e/ou relatados pelos pacientes. Para tal, avaliou-se a presença e os níveis de quarenta espécies bacterianas em uma amostra de 111 canais radiculares com polpas necróticas.

6.1- Prevalência das espécies:

A técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* possibilita a determinação de três tipos de dados, a prevalência (presença ou ausência), os níveis médios (contagem) e a proporção de cada espécie ou grupo de espécies presentes nas amostras.

Nossos dados reforçam o conceito de que as infecções endodônticas primárias possuem caráter polimicrobiano^{13, 16, 63, 64, 66, 76}. As amostras avaliadas continham de uma a quarenta espécies bacterianas (média de 22), sendo que 80% apresentaram 12 ou mais espécies. Os resultados encontrados na literatura são bastante conflitantes. Os trabalhos que utilizam cultura microbiana para a avaliação de polpas necróticas mostram diferenças quanto ao número de espécies bacterianas variando entre uma e 12⁶⁴ e entre três e sete espécies¹⁹. Já em um estudo que utilizou também o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* em 12 canais radiculares com necrose pulpar, foram encontradas de cinco a 33 espécies bacterianas (média de 17.3)⁶³. É interessante observar que o número de espécies detectadas pode estar diretamente relacionado com o tipo de teste de diagnóstico utilizado. Observa-se que grande parte dos estudos que utilizam cultura detecta uma menor variedade de espécies por canal radicular do que os que utilizam sondas de DNA.

No presente estudo as espécies encontradas com maior prevalência, estando presentes em mais de 70% dos canais foram *E. faecalis*, *C. gracilis*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. melaninogenica*, *F. nucleatum sp. vincentii*, *E. saburreum*, *V. parvula* e *S. anginosus*. Enquanto que as espécies com menor prevalência, em menos de 30% das amostras, foram *C. ochracea*, *P. acnes*, *A. israelii*, *S. intermedius*, *A. naeslundii* e *A. gerencseriae* (GRÁFICO 1, TABELA 3). Estes resultados estão em grande parte de acordo com outros estudos na literatura. Por exemplo, a espécie *F. nucleatum sp.vincentii* encontrada aqui em 85,7% dos canais, foi detectada por SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005) em 100% das amostras (n= 12) provenientes de infecções endodônticas primárias e avaliadas pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Outros autores, utilizando diversas técnicas de diagnóstico também mostraram uma prevalência elevada de *F. nucleatum* nestes processos infecciosos^{1, 2, 64, 65, 69, 71}. Dos BPPN testados neste estudo, a *P. melaninogenica* foi a espécie mais prevalente (86,6%) seguida da *P. gingivalis* (67%), *P. nigrescens* (64,6%), *P. intermedia* (58%) e *P.*

endodontalis (30,4%). GOMES *et al.*¹⁴ (2005) verificaram, em infecções primárias, a prevalência de *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *P. endodontalis*, por *PCR* em 38%, 25% 33% e 22% dos casos e por cultura em 0%, 13%, 13% e 1%, respectivamente. SORIANO DE SOUZA *et al.*⁶³ (2005), por meio de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, indicaram a *P. melaninogenica* e *P. gingivalis* (75%) como os BPPN mais prevalentes, seguidos da *P. intermedia* (50%), *P. nigrescens* (30%) e *P. endodontalis* (22%). Esses resultados são semelhantes aos nossos, com exceção de *P. nigrescens* que foi mais prevalente na nossa amostra (61,6%). Os métodos moleculares^{14, 63} diagnosticaram prevalências mais altas destes microrganismos do que o método de cultura¹⁴. Diversos outros estudos suportam estes achados^{4, 14, 22, 33, 63, 69}. Isto provavelmente ocorre devido à dificuldade em se cultivar algumas destas espécies. Uma observação curiosa foi o estudo de GOMES *et al.*¹⁴ (2005) detectar, por *PCR*, prevalências mais baixas de BPPN quando comparadas com os estudos que utilizaram *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (o presente estudo e de SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³, 2005). Uma hipótese que poderia ser levantada para explicar essas diferenças seria o método de coleta utilizado nessas pesquisas que no caso do estudo com *PCR*¹⁴ foi feito com cone de papel e nestes outros dois estudos com cones de papel e limas. Esta última forma de coleta poderia levar a obtenção de uma maior quantidade de material e, conseqüentemente, a uma maior detecção de certas espécies.

As espiroquetas, espécies reconhecidas como periodontopatógenos^{21, 60}, já haviam sido associadas às infecções pulpares por MILLER²⁸ em 1894. Devido ao fato destas bactérias serem anaeróbias estritas, fastidiosas e por não crescerem em meio sólido, sua presença nos processos infecciosos de origem endodôntica foi subestimada durante muito tempo. Apenas um século depois, com a introdução dos métodos de detecção molecular é que os treponemas começaram novamente a figurar como possíveis patógenos endodônticos. *T. denticola*, por exemplo, foi pela primeira vez identificada em infecções endodônticas em 2000 por meio do

PCR⁵¹. No presente trabalho, o *T. denticola* foi detectado em 53,6% dos casos e o *T. socranskii* em 35,7%. Vários estudos corroboram com nossos resultados. Com a utilização de PCR, SIQUEIRA Jr. e RÔÇAS⁴⁶ (2003-b) detectaram a espécie *T. socranskii* em 39,3% das amostras e RÔÇAS *et al.*³⁸ (2001) investigando a presença do complexo vermelho⁶⁰, do qual fazem parte o *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, verificaram a presença de *T. denticola* em 44% dos casos. Também, BAUMGARTNER, KHEMALEELAKUL e XIA³ (2003) detectaram o *T. socranskii* e o *T. denticola* em 44,9% e em 28,9% dos casos, respectivamente. RÔÇAS *et al.* (2003)³⁶ encontraram *T. denticola* em 78,1% dos casos e o *T. socranskii* em 40,6%. SIQUEIRA Jr. e RÔÇAS (2004)⁴⁸ verificaram *T. denticola* em 79% e *T. socranskii* em 26% dos casos de abscesso periapical agudo. Por meio do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, SIQUEIRA Jr. *et al.*⁵⁵ (2001) detectaram em casos de abscesso periapical agudo *T. denticola* em 50% das amostras de secreção purulenta. SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005), em amostras de infecções primárias, observaram *T. denticola* e *T. socranskii* em aproximadamente 45% e 25% dos casos, respectivamente. Estes valores foram bem superiores aos encontrados no trabalho de JUNG *et al.*²⁴ (2001) que, pelos testes de PCR e hibridização *dot-blot*, não observaram *T. denticola* em casos de periodontite apical e o *T. socranskii* foi encontrado em apenas 2,7% destes casos.

Outro periodontopatógeno pertencente ao complexo vermelho⁶⁰, *T. forsythensis* (antes *B. forsythus*)³⁹ foi identificado pela primeira vez em polpas necrosadas e infectadas pelo método do PCR por CONRADs *et al.*⁵ em 1997. No presente estudo e no estudo de SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005) esta espécie foi encontrada em 65,2% e 55% dos casos, respectivamente. Outros estudos também utilizando o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, apontaram esta espécie em 39% de 28 amostras de polpas necrosadas⁵⁴ e em 29,6% dos 27 casos de abscessos agudos⁵⁵. É interessante notar, todavia, que o nosso estudo ainda mostra uma prevalência mais alta do que os observados por SIQUEIRA Jr. *et al.*^{54, 55}

(2000 e 2001). Possíveis explicações para essas divergências são o número de amostras avaliadas nesses estudos e o meio no qual estas amostras foram mantidas. Nos estudos de SIQUEIRA Jr.^{54, 55} o meio de armazenamento utilizado foi o TSB-DMSO e em nosso estudo, o TE. Alguns estudos com *PCR* também observaram prevalências dessas espécies inferiores em relação aos nossos achados, variando entre 16,4% e 26% dos casos^{23, 24, 38}.

No gênero *Actinomyces*, a espécie mais prevalente no presente estudo foi *A. odontolyticus* (58%) seguido por *A. israelii* (27,7%), *A. naeslundii* (17%) e *A. gerencseriae* (15,2%). Esses resultados são semelhantes aos de XIA e BAUMGARTNER⁷³ (2003) que, utilizando *PCR*, encontraram *A. israelii* em 26,9% e *A. naeslundii* em 13,7% das amostras de canais radiculares infectados. GOMES *et al.*¹⁶ (2004) utilizando cultura, não encontraram *A. naeslundii* em nenhuma amostra de infecção endodôntica primária. Dados conflitantes aos nossos em relação a este gênero bacteriano foram descritos por SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005). Os autores utilizaram a mesma técnica de diagnóstico microbiológico do presente estudo e detectaram prevalências mais altas para três espécies de *Actinomyces*. *A. gerencseriae*, *A. israelii* e *A. naeslundii* apresentaram, respectivamente, em torno de 80%, 70% e 60% de prevalência, em contraste com 15,2%, 27,7% e 17 % observadas no presente estudo. Estas diferenças podem estar associadas ao número reduzido de amostras avaliadas no estudo de SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (n= 12). Porém, mais estudos utilizando diferentes técnicas de diagnóstico são necessários para que se possa avaliar o real papel dos *Actinomyces* nas infecções endodônticas.

O gênero *Streptococcus* tem sido detectado em infecções endodônticas primárias^{5, 58, 65} sendo encontrado em nossas amostras nas seguintes prevalências: *S. anginosus* (75%), *S. mitis* (65,2%), *S. gordonii* (55,4%), *S. constellatus* (42%), *S. oralis* (33,9%) e *S. intermedius* (24,1%). SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005) também observaram prevalências altas de

Streptococcus em polpas infectadas (*S. constellatus* em 80% e *S. sanguinis* em 75% dos casos).

A espécie *E. faecalis*, uma bactéria entérica, foi encontrada no presente estudo em prevalência elevada (89,3%). Este fato foi, de certa forma inesperado uma vez que esta espécie tem sido encontrada em casos de infecções endodônticas primárias tanto por cultura^{2, 58} quanto por métodos moleculares^{54, 55, 63}, em prevalências inferiores, em torno de 10% dos casos. *E. faecalis* tem sido normalmente mais relacionado a infecções persistentes^{16, 37, 58}. RÔÇAS, SIQUEIRA Jr. e SANTOS³⁷ (2004) verificaram, por meio do *PCR*, a ocorrência do *E. faecalis* em 18% dos casos de infecções primárias e em 67% dos casos de infecções persistentes. No presente estudo, além da alta frequência de detecção de *E. faecalis* nas amostras, os níveis e as proporções desta espécie também se mostraram bem elevados (GRÁFICOS 2 e 3). Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar esses resultados divergentes, como diferenças entre as técnicas de diagnóstico utilizadas e o tamanho das amostras. Uma outra possibilidade que deve ser considerada é o fato do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* não ter sido otimizado para a detecção deste gênero bacteriano, o que poderia, teoricamente, produzir reações cruzadas com outras espécies de *Enterococcus*. Para abordarmos melhor a questão analisamos novamente os dados, desta vez eliminando todos os sinais fraco-positivos ($<10^5$ e aproximadamente 10^5) para *E. faecalis*, o que provavelmente excluiria as possíveis reações cruzadas (dados não apresentados). Desta forma, a prevalência desta espécie caiu para 37,5% dos casos, tornando-se semelhante a de SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005), que também utilizaram *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e de RÔÇAS, SIQUEIRA Jr. e SANTOS³⁷ (2004) que utilizaram *PCR*. Nestes dois estudos, *E. faecalis* foi detectado em 40 e 33% dos casos, respectivamente.

Outro conhecido periodontopatógeno, o *A. actinomycetemcomitans*, foi detectado em nosso estudo em 47% dos casos. Prevalências inferiores a esta (por volta de 5%) são

apresentadas em trabalhos que utilizaram *Checkerboard DNA-DNA hybridization*^{54, 55, 63} enquanto que em dois estudos com *PCR* essa bactéria não foi detectada^{23, 53}. Uma questão importante a ser considerada na análise desses resultados é que no nosso estudo foram utilizadas sondas para duas cepas de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 e 29523) enquanto que no estudo de JUNG *et al.*²³ (2000), que utilizou *PCR* e não detectou a espécie, foram avaliadas cepas diferentes (ATCC 29522, 33384 e 43717). O segundo estudo utilizando *PCR*, que também não detectou o *A. actinomycetemcomitans* foi o de SIQUEIRA Jr. *et al.*⁵³ (2001-b). Porém, a comparação neste caso torna-se difícil uma vez que os autores não mencionam a cepa utilizada. Por outro lado, o estudo de SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005), que avaliou as duas mesmas cepas do nosso estudo encontrou dados mais semelhantes aos nossos, 30% dos canais estavam infectados com *A. actinomycetemcomitans*.

6.2- Contagem dos níveis das espécies

Os dados de contagem bacteriana do nosso estudo mostraram que grande parte das espécies mais prevalentes estavam também em níveis e proporções mais altos (GRÁFICOS 1, 2 e 3). Isto ocorreu, por exemplo, para *F. nucleatum sp. vincentii*, *E. saburreum*, *E. faecalis*, *N. mucosa*, *V. parvula*, *C. gracilis* e *P. gingivalis*. O mesmo perfil foi observado para as espécies menos prevalentes, que mostraram contagens baixas, como no caso de *P. acnes*, *A. naeslundii* I, *S. intermedius*, *A. israeli*, *S. oralis* e *A. gerencseriae*. É interessante observar que algumas dessas espécies encontradas em baixas prevalências e contagens são menos virulentas, como as do gênero *Streptococcus* e *Actinomyces*⁶⁰. Dois importantes patógenos, *T. socranskii* e *P. endodontalis*, também estavam presentes nestas amostras em contagens elevadas, e foram detectadas em aproximadamente 30% dos casos. Outro grupo que esteve presente em níveis e prevalência relativamente altos abrange diversas espécies patogênicas

como *M. micros*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum sp. nucleatum*, *F. periodonticum* e *T. forsythensis*.

Dividindo as quarenta espécies avaliadas em um grupo com as vinte espécies mais numerosas e outro grupo com as vinte menos numerosas (GRÁFICO 2) observa-se que a grande maioria das espécies consideradas mais virulentas encontra-se no primeiro grupo enquanto que a maioria das espécies consideradas menos agressivas estão no segundo grupo. Este dado sugere que a quantidade das bactérias presentes nas amostras também pode ser um indicador importante da patogenicidade do processo infeccioso. JUNG *et al.*²⁴ (2001) já haviam sugerido que a severidade da infecção endodôntica talvez se dê não apenas pela presença dos patógenos, mas principalmente pela quantidade desses microrganismos nas infecções endodônticas. O método do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* utilizado no presente estudo, oferece esta vantagem sobre outros métodos de diagnóstico, pois permite a quantificação bacteriana. A comparação das informações sobre níveis bacterianos do presente estudo é difícil, uma vez que, ao nosso conhecimento, apenas um estudo científico anterior ao nosso quantificou a microbiota presente em infecções endodônticas primárias⁶³. Alguns dados de níveis bacterianos apresentados neste estudo estão em concordância com o nosso, enquanto outros são divergentes. Por exemplo, SORIANO de SOUZA *et al.*⁶³ (2005) também observaram níveis bacterianos altos para as espécies *F. nucleatum sp. vincentii*, *V. parvula*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *C. ochracea*. Por outro lado, os *Actinomyces* que no nosso estudo apareceram em baixas concentrações, foram detectados em contagens altas por esses autores. Diferenças no número de amostras podem influenciar nesses resultados, porém, outros estudos são necessários para que conclusões mais definitivas possam ser obtidas. Uma outra vantagem em se definir os níveis bacterianos é a possibilidade de se fazer associações mais consistentes com sinais e sintomas clínicos. Baseado nisto é que optamos por analisar mais

profundamente a relação entre sinais e sintomas clínicos com os níveis apresentados pelas quarenta espécies bacterianas testadas. Este aspecto será abordado na sessão 6.4.

6.3- Avaliação dos grupos e complexos microbianos:

Com o objetivo de entender melhor a microbiota dos canais radiculares agrupamos as espécies avaliadas de duas maneiras, de acordo com os diferentes gêneros (TABELA 7) e de acordo com os complexos microbianos periodontais descritos por SOCRANSKY *et al.*^{59, 60} (TABELA 8).

Com a primeira análise, por gêneros (GRÁFICO 12), observamos que os grupos com contagens mais altas foram os que abrigavam as espécies do gênero *Fusobacterium*, um grupo que abrigava diversas espécies patogênicas, que foi denominado de patógenos e um terceiro grupo, chamado de outros, composto por gêneros variados com características menos agressivas. Já os gêneros com níveis mais baixos foram *Actinomyces*, *Capnocytophaga* e *Streptococcus*. Este perfil microbiológico é compatível com infecções que estão confinadas a um ambiente que favorece a anaerobiose, como o do sistema de canais radiculares. Realizamos também avaliação da microbiota de nossa amostra no formato dos complexos microbianos periodontais^{59, 60}. As únicas alterações feitas nas sondas no nosso estudo foram a substituição de *S. sanguinis* (complexo amarelo) e *A. viscosus* (grupo azul) por *E. faecalis* e *P. endodontalis*. A maioria das espécies bacterianas estudadas no presente trabalho já foi encontrada em infecções endodônticas^{5, 24, 38, 45, 54} e são as mesmas que compõem os complexos microbianos periodontais descritos por SOCRANSKY *et al.*^{59, 60}. Aqui, nota-se novamente, um perfil microbiano compatível com infecções anaeróbias mistas, inclusive com o observado na periodontite crônica. Os complexos laranja e vermelho, que abrigam diversas espécies mais patogênicas, representam 50% da microbiota enquanto que os grupos azul, roxo, verde e amarelo formados por diversas espécies consideradas, em periodontia, como

compatíveis com o hospedeiro totalizam apenas 13%. *E. faecalis*, *L. buccalis* e *N. mucosa* (outros 1) também estavam em proporções altas, 16,47% da microbiota (GRÁFICO 17).

6.4- Relação da microbiota com sinais e sintomas clínicos:

6.4.1) Presença ou ausência de dor

Os casos sintomáticos tiveram uma concentração total de bactérias significativamente maior do que os casos assintomáticos (GRÁFICO 4). Essa associação havia sido sugerida por YOSHIDA *et al.*⁷⁴ (1987). Quando avaliadas individualmente, a vasta maioria destas espécies estava em concentrações mais altas nos casos de dor, incluindo alguns importantes patógenos, como *T. forsythensis* ($p < 0,05$), *T. socranskii* e *P. gingivalis* (GRÁFICO 5). Um dado bastante interessante foi que a proporção do complexo vermelho, o grupo mais relacionado à etiopatogenia da doença periodontal, estava significativamente elevada nos casos de presença de dor (GRÁFICO 18).

6.4.2) Presença ou ausência de fístula

A quantidade total dos microrganismos avaliados foi similar nos casos de presença ou ausência de fístula (GRÁFICO 6). Algumas espécies foram encontradas em níveis significativamente mais altos nos casos sem fístula, como *E. faecalis*, *S. anginosus*, *C. sputigena* e *C. gingivalis*. Apesar de não significativo, os níveis de *P. gingivalis* e *F. nucleatum sp. nucleatum* mostraram-se bem mais altos nos casos de presença de fístula (GRÁFICO 7). Cabe ressaltar, que a espécie *F. nucleatum sp. vincentii* estava presente em todos os casos de fístula (TABELA 4).

Um dado interessante foi a diferença nas proporções dos complexos microbianos associadas a este aspecto clínico (GRÁFICO 19). O grupo que apresentou fístula mostrou um

perfil microbiológico mais agressivo em comparação com o grupo sem fístula, com proporções elevadas de patógenos dos grupos laranja e vermelho, as expensas de uma profunda redução dos grupos amarelos, verde, roxo e azul.

6.4.3) Câmara pulpar aberta ou fechada

Apesar de não significativo, o grupo com câmara pulpar fechada apresentou uma concentração mais elevada de microrganismos do que o grupo com câmara pulpar aberta (GRÁFICO 8). Esses dados parecem ter fundamento uma vez que um ambiente fechado é mais propício à multiplicação bacteriana, especialmente em casos de infecção anaeróbia^{65, 66, 67}. Em um estudo por cultura, CHU *et al.*⁴ (2005) verificaram que a espécie *F. nucleatum* estava significativamente mais presente ($p < 0,05$) nos casos de polpas não expostas; resultado este que está em concordância com o presente trabalho.

6.4.4) Tamanho da lesão perirradicular

Como apenas oito casos na presente amostra não apresentaram lesão perirradicular tornou-se difícil qualquer associação entre presença ou ausência deste parâmetro. Assim, optamos por relacionar a microbiota com o tamanho da lesão presente ($< 20\text{mm}^2$ ou $\geq 20\text{mm}^2$)⁶. Foi encontrado ligeiro aumento na concentração bacteriana em casos de lesões $\geq 20\text{mm}^2$, apesar de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa. SUNDQVIST (1976)⁶⁴ já havia observado que quanto maior a lesão periapical, maior era o número de cepas isoladas e maior a densidade bacteriana. Provavelmente os fatores tempo de infecção instalada^{10, 29} e resposta do hospedeiro sejam importantes neste quesito. Entretanto, a verificação da influência do tempo de infecção na presença e/ou tamanho de lesão perirradicular apenas poderia ser realizada em estudos com cobaias, já que não é possível, em humanos, determinar quando ocorreu a instalação deste processo.

6.5- Comparação entre as técnicas de diagnóstico microbiológico:

Existe uma variação muito grande de métodos de diagnóstico microbiológico, técnicas de coleta¹⁴, quantidade³⁰ e seleção das amostras¹⁴, podendo levar a diferentes resultados. Tal fato pode explicar o porquê de algumas diferenças observadas entre os resultados do presente trabalho e dos demais aqui discutidos.

A utilização de limas tipo Hedström associadas às pontas de papel absorvente para realizar a coleta de material do interior dos canais radiculares, como foi feito em nosso estudo, possibilita a obtenção de uma quantidade maior de amostra, pois a parte ativa do instrumento fornece excelente capacidade de corte e remoção de resíduos²⁷. Em grande parte dos trabalhos isto se dá apenas com a utilização de pontas de papel^{12, 16, 15, 22, 23, 24, 58, 73}, e em alguns com o auxílio de limas tipo K^{47, 50, 63}.

Inúmeros métodos foram e têm sido utilizados para a identificação dos microrganismos orais. Entretanto, não existe um método capaz de reconhecer e quantificar todos os microrganismos encontrados no espaço pulpar e estruturas adjacentes¹⁶. O método de cultura microbiana, considerado durante muito tempo como o *gold-standard*, é o método contra o qual os demais testes são normalmente comparados e validados⁷⁵. Esta técnica é extremamente importante na busca de novas espécies^{35, 75} e na determinação de sensibilidade e resistência bacteriana aos antibióticos⁷⁵. Entretanto, a cultura é um método custoso e demorado, dificultando a análise de grande número de amostras além de não ser capaz de detectar bactérias de difícil cultivo. Seu limite de detecção é de aproximadamente 10^3 células bacterianas em meios seletivos e 10^4 - 10^5 em meios não seletivos⁷⁵. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular como o *PCR* e o *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, tem sido possível detectar espécies bacterianas que pelo método de cultura não eram apontadas como presentes nas infecções endodônticas^{5, 24, 51}. O *PCR* parece ser o mais

sensível dentre estes métodos sendo seu limite de detecção de 10 células bacterianas^{52, 75}. É um método rápido, capaz de detectar espécies não viáveis⁷⁵. As principais desvantagens desta técnica são o custo elevado e a não quantificação dessas espécies nas amostras⁷⁵. O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* é um método amplamente utilizado nos estudos microbiológicos de grande porte em periodontia^{21, 62}. Como vantagens pode-se citar baixo custo, avaliação simultânea e rápida de um grande número de amostras e diferentes espécies bacterianas^{62, 75}, além da possibilidade de quantificação bacteriana^{61, 62}. Seu limite de detecção é de 10⁴ células bacterianas⁶¹ sendo capaz de detectar espécies não viáveis^{61, 75}. A maior desvantagem associada a esta técnica é a possível ocorrência de reações cruzadas entre espécies taxonomicamente similares. Entretanto, inúmeros testes vêm sendo realizados para aumentar a especificidade das sondas utilizadas^{61, 75}. SOCRANSKY *et al.*⁶¹ (2004) reportaram que a especificidade da técnica se dá em torno de 93,5% e que quando reações cruzadas ocorreram eram sempre intragênero e bastante limitadas^{60, 61}. PAPAPANOU *et al.*³⁵ (1997) comparando as metodologias do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e cultura observaram que o *Checkerboard* resultou em prevalências mais altas para mais da metade das cepas testadas em comparação aos dados obtidos por cultura, entre elas *T. forsythensis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*.

6.6- Considerações finais:

Apesar do caráter infeccioso das alterações patológicas da polpa dental já ter sido estabelecido há muitas décadas, apenas recentemente, com o desenvolvimento das técnicas modernas de diagnóstico microbiológico, essas infecções têm sido melhor estudadas.

Neste sentido, o presente estudo traz informações importantes, principalmente por ter avaliado um número grande de amostras e de espécies bacterianas. Foi realizada uma análise consistente do perfil microbiológico de infecções endodônticas primárias, não só em termos

de prevalência das espécies testadas, mas também dos níveis e proporções destes microrganismos ou grupo de espécies, no ambiente intracanal.

O melhor entendimento desta microbiota trará benefícios clínicos diretos, uma vez que permitirá o estabelecimento de estratégias preventivas e terapêuticas mais específicas para essas infecções.

CONCLUSÕES

7- Conclusões:

A partir da proposição do trabalho, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, parece lícito concluir que:

1- A microbiota presente em infecções endodônticas primárias apresenta perfil misto, composto por diferentes espécies bacterianas. As espécies encontradas em maiores níveis ou prevalência foram *F. nucleatum sp. vincentii*, *E. saburreum*, *E. faecalis*, *N. mucosa*, *V. parvula*, *C. gracilis*, *T. socranskii*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *M. micros*, *P. nigrescens* e *F. nucleatum sp. nucleatum*.

2- Diferentes espécies bacterianas foram relacionadas com os sinais e sintomas clínicos avaliados. Níveis mais altos de *E. faecalis*, *S. anginosus*, *C. sputigena* e *C. gingivalis* estavam presentes em casos de ausência de fístula; *F. nucleatum sp. vincentii* e *C. ochracea* nos casos de câmara pulpar fechada e *S. intermedius*, *A. naeslundii* e uma proporção mais elevada do complexo azul nos casos de lesões $\geq 20\text{mm}^2$. Contagem bacteriana total e níveis de *T. forsythensis* elevados estão relacionados com a presença de dor, assim como uma maior proporção do complexo vermelho (*T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *T. denticola*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- Referências Bibliográficas:

1. ASSED, S.; ITO, I. Y.; LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; LOPATIN, D. E. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod Dent Traumatol**, v. 12, p. 66-9, 1996.
2. BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J Endod**, v. 17, n. 8, p. 380-383, Aug. 1991.
3. BAUMGARTNER, J. C.; KHEMALEELAKUL, S.; XIA, T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. **J Endod**, v. 29, n. 12, p.794-7, Dec. 2003.
4. CHU, F. C. S.; TSANG, C. S. P.; CHOW, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. **J Endod**, v. 31, n. 6, p. 424-9, June 2005.
5. CONRADS, G.; GHARBIA, S. E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H. N. The use of a 16S rDNA Directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. **J Endod**, v. 23, n. 7, p. 433-8, July 1997.
6. CONSOLARO, A.; RIBEIRO, F. C. Periapicopatias: etiopatogenia e inter-relações dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. In: **Endodontia: Tratamento de canais radiculares**. 3ª ed. São Paulo: Panamericana, 1998. cap.5, p. 77-102.
7. DOUGHERTY, W. J.; BAE, K. S.; WATKINS, B. J.; BAUMGARTNER, J. C. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. **J Endod**, v. 24, n. 5, p. 356-8, May 1998.
8. ENGLER-BLUM, R.; MEIER, M.; FRANK, J.; MULLER, G. A. Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. **Anal Biochem**, v. 132, p. 235-44, 1993.
9. FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; ÖHMAN, A. F.; MÖLLER, A. J. R. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scan J Dent Res**, v. 90, n. 3, p. 134-44, Mar. 1982.
10. FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S. E.; MÖLLER, A. J. R. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scan J Dent Res**, v. 90, p. 200-6, Mar. 1982.
11. FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, v. 132, p. 6-13, 1983.

12. FOSCHI, F.; CAVRINI, F.; MONTEBUGNOLI, L.; STASHENKO, P.; SAMBRI, V.; PRATI, C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, p. 289-95, Oct. 2005.
13. GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int Endod J**, v. 27, p. 291-8, 1994.
14. GOMES, B. P. F. A.; JACINTO, R. C.; PINHEIRO, E. T.; SOUSA, E. L. R.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, p. 211-5, 2005.
15. GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int Endod J**, v. 29, p. 69-75, 1996.
16. GOMES, B. P. F. A.; PINHEIRO, E. T.; GADÊ-NETO, C. R.; SOUSA, E. L. R.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 71-6, 2004.
17. GONÇALVES, R. B.; MOUTON, C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. **J Endod**, v. 25, n. 5, p. 336-40, May 1999.
18. GRIFFEE, M. B.; PATTERSON, S. S.; MILLER, C. H.; KAFRAWY, A. H.; NEWTON, C. W. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 50, n. 5, p. 457-61, Nov. 1980.
19. HAAPASALO, M.; RANTA, H.; RANTA, K. T.; SHAH, H. Black-pigmented *Bacteroides spp.* in human apical periodontites. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 149-53, July 1986.
20. HAAPASALO, M. ***Bacteroides ssp.* in dental root canal infections.** **Endod Dent Traumatol**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 1989.
21. HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT Jr, R. L.; SOCRANSKY, S. S. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J Clin Periodontol**, v. 24, p. 767-76, 1997.
22. JACINTO, R. C.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA FILHO, F. J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical

periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. Oral Microbiol Immunol, v. 18, p. 285-92, 2003.

23. **JUNG, I.; CHOI, B.; KUM, K.; ROH, B.; LEE, S., LEE, C.; PARK, D. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. J Endod, v. 26, n. 10, Oct. 2000.**
24. JUNG, I.; CHOI, B.; KUM, K.; YOO, Y.; YOON, T.; LEE, S., LEE, C. 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**, v. 92, p. 329-34, 2001.
25. KANTZ, W. E.; HENRY, C. A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact chambers of non-vital teeth in man. **Arch Oral Biol**, v. 19, n. 1, p. 91-96, 1974.
26. KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in *germ-free* and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, n. 3, p. 340-9, 1965.
27. LEAL, J. M.; LEONARDO, R. T.; LEONARDO, M. R. Aparelhos, material e instrumental endodôntico: classificação, apresentação, reconhecimento e organização. In: **Endodontia: Tratamento de canais radiculares**. 3ª ed. São Paulo: Panamericana, 1998. cap.10, p. 215-52.
28. MILLER, W. D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dental Cosmos**, v. 36, p. 505-28, 1894.
29. MÖLLER, A. J. R.; FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; ÖHMAN, A. F.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scan J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 475-84, June 1981.
30. MORAES, S. R.; SIQUEIRA Jr, J. F.; COLOMBO, A. P.; RÔÇAS, I. N.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. **J Endod**, v. 28, n. 2, p. 86-9, Feb. 2002.
31. MURDOCH, D. A.; SHAH, H. N. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. **Anaerobe**, v. 5, p. 555-9, 1999.
32. NG, Y. L.; SPRATT, D.; SRISKANTHARAJAH, S.; GULABILAVA, K. Evaluation of protocols for field decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. **J Endod**, v. 29, n. 5, p. 317-20, May 2003.
33. OLIVEIRA, J. C. M.; SIQUEIRA Jr, J. F.; ALVES, G. B.; HIRATA Jr, R.; ANDRADE, A. F. B. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root

- canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **J Endod**, v. 26, n. 12, Dec. 2000.
34. PANTERA Jr, E. A.; ZAMBON, J. J.; SHIH-LEVINE, M. Indirect immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. **J Endod**, v. 14, n. 5, p. 218-23, May 1988.
 35. PAPAPANOU, P. N.; MADIANOS, P. N.; DAHLÉN, G.; SANDROS, J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. **Eur J Oral Sci**, v. 105, p. 389-96, 1997.
 36. RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr, J. F.; ANDRADE, A. F. B.; UZEDA, M. Oral Treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. **Int Endod J**, v. 36, n. 1, p. 20-6, Jan. 2003.
 37. RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v. 30, n. 5, p. 315-20, May 2004.
 38. RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr, J. F.; SANTOS, K. R. N.; COELHO, A. M. A. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, p. 468-71, 2001.
 39. SAKAMOTO, M.; SUZUKI, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, L.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.* 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, p. 841-9, 2002.
 40. SELTZER, S.; FARBER, P.A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 5, p. 634-45, Nov. 1994.
 41. SHAH, H. N.; COLLINS, M. D. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 38, n. 1, p. 128-31, Jan. 1988.
 42. _____. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 40, p. 205-8, 1990.
 43. SIQUEIRA Jr, J. F. Endodontics infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 94, n. 3, p. 281-93, Sept. 2002.
 44. SIQUEIRA Jr, J. F.; MAGALHÃES, F. A. C.; LIMA, K. C.; UZEDA, M. Pathogenicity of facultative and obligate anaerobic in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 1, p. 368-72, 1998.

45. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N. *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. **Int Endod J**, v. 36, n. 3, p. 174-80, Mar. 2003(a).
46. _____. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by Nested PCR. **J Endod**, v. 29, n. 4, p. 244-7, Apr. 2003(b).
47. _____. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by Nested PCR. **J Endod**, v. 29, n. 6, p. 390-3, June 2003(c).
48. _____. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 336-9, 2004.
49. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N.; ALVES, F. R. F.; SANTOS, K. R. N. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canal: a molecular investigation. **J Endod**, v. 30, n. 9, p. 638-43, Sept. 2004.
50. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N.; ANDRADE, A. F. B.; UZEDA, M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. **J Endod**, v. 29, n. 2, p. 111-3, Feb. 2003.
51. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N.; FAVIERI, A.; OLIVEIRA, J. C. M.; SANTOS, K. R. N. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canal. **Int Endod J**, v. 34, p. 280-4, 2001.
52. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N.; OLIVEIRA, J. C. M.; SANTOS, K. R. N. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 27, n. 9, Sept. 2001(a).
53. _____. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. **J Endod**, v. 27, n. 3, Mar. 2001(b).
54. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 89, p. 744-8, 2000.
55. _____. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 92, p. 451-7, 2001.
56. _____. Actinomyces species, Streptococci and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. **J Endod**, v. 28, n. 3, p.168-71, Mar. 2002.
57. SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P.; SANTOS, K. R. N. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of selected endodontic pathogens. **J Med Microbiol**, v. 51, p. 1090-6, 2002.
58. SIREN, E. K.; HAAPASALO, M. P. P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E. N. J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int Endod J**, v. 30, n. 2, p. 91-5, Mar. 1997.

59. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology** **2000**, v. 28, p. 12-55, 2002.
60. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT Jr, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb. 1998.
61. SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; SMITH, C.; MARTIN, L.; HAFFAJEE, J. A.; UZEL, N. G.; GOODSON, J. M. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 352-62, 2004.
62. SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; LEVIN, A. E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 788-92, 1994.
63. SORIANO DE SOUZA, C. A.; TELES, R. P.; SOUTO, R.; CHAVES, M. A. E.; COLOMBO, A. P. V. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. **J Endod**, v. 31, n. 2, p. 79-83, Feb. 2005.
64. SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. 1976. Dissertation (PhD). University of Umea, Umea, Sweden. IN: MORSE, D. R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int Endod J**, v. 14, n. 2, p. 69-79, 1981.
65. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol**, v. 7, p. 257-62, 1992(a).
66. _____. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v. 18, n. 9, p. 427-30, Sept. 1992(b).
67. _____. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 4, p. 522-30, Oct. 1994.
68. SUNDQVIST, G.; ECKERBOM, M. I.; LARSSON, A. P.; SJÖGREN, U. T. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. **Infect Immun**, v. 25, n. 2, p. 685-93, Aug. 1979.
69. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **J Endod**, v. 15, n. 1, p. 13-9, Jan. 1989.
70. VAN WINKELHOFF, A. J.; VAN STEENBERGEN, T. J. M.; GRAAFF, J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. **J Clin Periodontol**, v. 15, p. 145-55, 1988.
71. VIANNA, M. E.; HORZ, H. P.; GOMES, B. P. F. A.; CONRAD, G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, p. 253-258, 2005.

72. **WU, M. K.; MOORER, W. R.; WESSELINK, P. R. Capacity of anaerobic bacteria enclosed in a simulated root canal to induce inflammation. Int Endod J, v. 22, p. 269-77, 1989.**
73. **XIA, T.; BAUMGARTNER, J. C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. J Endod, v. 29, n. 9, p. 549-52, Sept. 2003.**
74. **YOSHIDA, M.; FUKUSHIMA, H.; YAMAMOTO, K.; OGAWA, K.; TODA, T.; SAGAWA, H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. J Endod, v. 13, n. 1, p. 24-8, Jan. 1987.**
75. **ZAMBON, J. J.; HARASZTHY, V. I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontology 2000, v. 7, p. 69-82, 1995.**
76. **ZAVISTOSKI, J.; DZINK, J.; ONDERDONK, A.; BARTLETT, J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 49, n. 2, p.171-4, Feb. 1980.**

