

**ANTÔNIO SCALCO FABRIS**

**ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE INFECÇÕES PULPARES  
EM DENTES DECÍDUOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos.

**SÃO PAULO  
2011**

## RESUMO

Fabris AS. Análise bacteriológica de infecções pulpares em dentes decíduos. [tese (Doutorado em Microbiologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Foram analisados dentes decíduos com cárie dental profunda de 110 crianças, sendo coletadas 103 amostras de polpa necrosada e 7 de fístulas gengivais. Morfotipos bacterianos foram visualizados pelas colorações de Gram e Brenn-Brown, e os DNA foram obtidos e usados na detecção bacteriana por PCR. A predominância de cocos Gram-positivos (81,8%) e cocobacilos Gram-negativos (49,1%) foram observadas. Em 88 amostras de polpas, microrganismos com maior ocorrência foram: *Enterococcus* spp. (50%), *P. gingivalis* (49%), *F. nucleatum* (25%) e *P. nigrescens* (11,4%). Foram detectados em fístulas: *P. gingivalis* (43%), *Enterococcus* spp. (28,6%), *F. nucleatum* (14,3%), *P. nigrescens* (14,3%), e *D. pneumosintes* (14,3%). Os resultados permitem concluir que a microbiota envolvida nas infecções pulpares em dentes decíduos é similar em termos qualitativos àquela observada em dentes permanentes. Entretanto, a predominância de *Enterococcus* spp. e *P. gingivalis* deve ser levada em consideração pelos clínicos em casos necessários de tratamento endodôntico em crianças com dentição decídua.

Palavras chave: Dente Decíduo. Infecções Pulpares. PCR.

## ABSTRACT

Fabris AS. Bacteriological analysis of pulp infection in deciduous teeth. [Ph. D thesis (Microbiology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

In this study, deciduous teeth with deep caries from 110 children, with 103 pulp necrosis and 7 gingival fistula samples were evaluated. Bacterial morphotypes were visualized by Gram staining and Brown-Brenn. DNA were obtained and used in bacterial detection by using PCR. The predominance of Gram-positive cocci (81.8%) and Gram-negative coccobacilli (49.1%) were observed. In 88 pulp samples high frequencies of microorganisms were: *Enterococcus* spp. (50%), *P. gingivalis* (49%), *F. nucleatum* (25%) and *P. nigrescens* (11.4%). In fistulas were detected: *P. gingivalis* (43%), *Enterococcus* spp. (28.6%), *F. nucleatum* (14.3%), *P. nigrescens* (14.3%), and *Dialister pneumosintes* (14.3%). Our results, suggest that the involved microbiota in pulp infections of deciduous teeth are qualitatively similar than those permanent teeth. However, a predominance of *Enterococcus* spp. and *P. gingivalis* was observed, and it must be considered in the endodontic treatment in children with primary dentition.

Keywords: Deciduous Teeth. Pulp Infection. PCR.

## INTRODUÇÃO

Em vários países, entre eles o Brasil, o exercício profissional na área de saúde tem estimulado o tratamento das doenças bucais, e não as diferentes formas de prevenção. Isso tem elevado a taxa de infecções nos estágios avançados, como nos processos endodônticos em dentes decíduos, onde há comprometimento da polpa (Reisine e Psoter, 2001; Cooper et al., 2010). Estudos realizados por Reeves e Stanley (1966), já relatavam que 75% dos dentes decíduos com cárie profunda podem desenvolver infecções na polpa dental.

Segundo dados do Ministério da Saúde (Brasil, 2004), a incidência de cárie na dentição decídua em crianças brasileiras é expressiva, particularmente, em crianças  $\leq 3$  anos de idade; e em crianças entre 5 a 12 anos, apresentando pelo menos três dentes cariados. A presença de placa bacteriana e o tipo de dente são variáveis associadas com lesões ativas de cárie em superfícies oclusais de dentes decíduos (Braga et al., 2010).

Os dentes decíduos são importantes na infância, servindo como guia para a erupção da dentição permanente. Contribuem, também, para o desenvolvimento dos maxilares, junto ao processo da mastigação, preparando o alimento para a digestão e assimilação de nutrientes na etapa em que a criança está em crescimento. A perda prematura desses elementos dentais, além das sequelas estéticas, acarreta diminuição do espaço no arco dental, com alteração da guia de erupção do sucessor permanente, podendo trazer como conseqüências, problemas fonéticos e surgimento de hábitos bucais nocivos, tal como interposição da língua, entre outros (Cuoghi et al., 1998; Thilander, 2009).

No dente decíduo, a câmara pulpar é mais ampla em relação aos dentes permanentes, os cornos pulpares são mais proeminentes, podendo facilitar a exposição da polpa pela cárie dental ou lesão traumática, como fraturas dentais, levando à necrose do tecido (Linde, 1985; Morabito e Defabianis, 1992). A necrose pulpar implica na parada dos processos metabólicos da polpa dental, com a conseqüente perda de sua estrutura, bem como de suas defesas

naturais. A exposição do tecido pulpar ao meio bucal e sua decomposição permitirão o livre acesso de microrganismos da microbiota oral a esse tecido oferecendo condições ideais para a proliferação microbiana no interior do canal radicular (Hobson, 1970; Sundqvist, 1994; Nagaoka et al., 1995; Bolan e Rocha, 2007; Cooper et al., 2010).

Segundo Kakehashi et al. (1965), a dinâmica de contaminação da polpa por microrganismos possui uma via direta (cárie dental, canalículos dentinários e fraturas dentais); outra por contiguidade (contaminação pela região vizinha); via linfática ou retrógrada (terapia periodontal e traumas físicos); e via hematogênica, através da corrente sanguínea, fenômeno denominado de anacorese.

Analisando a anatomia dos molares decíduos, entre a câmara coronária e a região óssea que envolve as raízes, a camada de dentina é pouco espessa, além de conter canais acessórios (Moss et al., 1965; Vermot-Gaud, 1967). Nessa área podem ocorrer comunicações entre a câmara pulpar e os tecidos periodontais, por onde também bactérias e suas toxinas, assim como os produtos da decomposição tecidual pulpar podem se difundir, resultando na reabsorção do tecido ósseo alveolar vizinho (Fanning, 1962; Winter, 1962; Morabito e Defabianis, 1992). Foi descrito também um provável acesso de bactérias presentes na microbiota oral pela junção gengiva-esmalte, quando o dente decíduo está em processo de reabsorção (Harokopakis-Hajishengallis, 2007). A invasão da polpa e áreas periapicais pode também promover o desenvolvimento de abscesso dento-alveolar e fístula, disseminando a infecção para outras áreas anatômicas próximas (MacDonald et al., 1957; Cohen et al., 1960; Shovelton, 1964; Akpata e Blechman, 1982; Brook, 2003).

A terapêutica da necrose pulpar em dentes decíduos sempre foi um tema complexo, devido: 1) à sua anatomia e irregularidades causadas pelas reabsorções fisiológicas que dificultam o acesso a todo o conduto radicular durante o tratamento (Vermot-Gaud, 1967; Morabito e Defabianis, 1992; Thomas et al., 1994; Rimondini e Baroni, 1995; Bolan e Rocha, 2007); 2) ao desconhecimento dos microrganismos, que podem estar envolvidos no processo infeccioso (Önçag et al., 2006; Silva et al., 2006; Rocha et al., 2008).

O tratamento endodôntico é uma rotina na prática clínica odontopediátrica e constitui uma das últimas manobras para que se possa preservar o dente que teve o tecido pulpar necrosado ou comprometido de forma irreversível (Marsh e Largent, 1967; Sjögren et al., 1997). Apesar de o tratamento ter sido descrito há algumas décadas, até hoje existem controvérsias para essa terapia, não existindo um protocolo definido ou padronizado (Thomas et al., 1994; Önçag et al., 2003; Dunston e Coll, 2008).

Os primeiros estudos publicados sobre a etiologia das infecções endodônticas em dentes decíduos mostraram a presença de bactérias aeróbias e facultativas, devido às limitações das técnicas de isolamento (Cohen et al., 1960; Marsh e Largent, 1967). Hobson (1970) observou em dentes decíduos cariados a presença de morfotipos bacterianos no interior dos túbulos dentinários e na região do assoalho da câmara pulpar. Com o surgimento de técnicas de cultivo para bactérias anaeróbias, surgiram novos estudos demonstrando que as infecções endodônticas são polimicrobianas e apresentando bactérias anaeróbias estritas (Brook et al., 1981; Toyoshima et al., 1988; Brook et al., 1991; Sato et al., 1993; Pazelli et al., 2003; Silva et al., 2006).

Em revisão da literatura, Brook et al. (2003) descreveram as espécies bacterianas mais predominantes em pulpites e em abscessos de origem endodôntica em crianças, correspondendo aos gêneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

Em ecologia microbiana, tem sido demonstrado que algumas espécies bacterianas com baixa incidência nas diversas infecções podem ser espécies importantes dentro de consórcios mistos complexos, sendo resultado de alterações ambientais, no sentido de que elas poderiam se tornar dominantes, em resposta às mudanças nas condições que favorecem o seu crescimento (Sogin et al., 2006). Assim, de uma perspectiva ecológica, todas as espécies em uma comunidade mista devem ser detectadas e identificadas com êxito (Siqueira e Rôças, 2009).

Estudos moleculares recentes têm revelado que quase 700 espécies bacterianas distintas podem habitar a cavidade oral humana, embora nem todas elas colonizem o mesmo indivíduo ao mesmo tempo. Normalmente, cerca de 100 a 200 espécies fazem parte da microbiota oral, indicando que existe uma diversidade microbiana considerável nesse ecossistema (Paster et al., 2006).

Em adultos, algumas espécies bacterianas que são encontradas em infecções endodônticas (Kerekes e Olsen, 1990; Gharbia et al., 1994; Sundqvist, 1994; Conrads et al., 1997; Bogen e Slots, 1999; Siqueira et al., 2000; Fouad et al., 2002), também foram descritas em periodontites (Naito e Gibbons, 1988; Moore et al., 1985; Avila-Campos e Velásquez-Meléndez, 2002). Entretanto, em infecções de polpa e fístulas de crianças ainda não foi verificada essa relação. Trabalhos realizados em crianças da Turquia relatam elevada ocorrência de *E. faecalis* em infecções de polpa em dentes decíduos, mais isso ainda não foi pesquisado em outros países (Önçag et al., 2006; Cogulu et al., 2007; Cogulu et al., 2008a).

## CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Cocos Gram-positivos foram predominantes em relação aos cocobacilos Gram-negativos, entretanto, as associações desses dois morfotipos foram comumente observadas;
2. *Enterococcus* spp. e *P. gingivalis* foram os mais predominantes nas amostras clínicas de polpa e fístulas; e
3. Associações bacterianas foram frequentemente observadas em ambos os casos clínicos que afetaram as crianças examinadas.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. J Dent Res. 1982;61(2):435-8.

Agematsu H, Sawada T, Watanabe H, Yanagiisawa T, Ide Y. Immuno-scanning electron microscope characterization of large tubules in human deciduous dentin. Anat Rec. 1997;248:339-45.

Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol. 1999;37:1426-30.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol. Immunol. 1996;11:266-73.

Avila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AS, Mayer LW. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. J Periodontol. 1999a;70:1202-8.

Avila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AS, Mayer LW. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol. 1999b;26:699-704.

Avila-Campos MJ, Velásquez-Meléndez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2002;44:1-5.

Barnett EM, Mehta JD. Oral growth stages--the keys to guiding occlusal development. J Am Dent Assoc. 1970;81(6):1360-8.

Baroni C, Rimondini L. Space maintenance and endodontic follow-up: case reports. J Clin Pediatr Dent. 1992;16(2):94-7.

---

<sup>1</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bolan M, Rocha MJC. Histopathologic study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:680-5.

Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(1):55-71.

Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1999;32(3):204-10.

Boyle PE. Intracellular bacteria in a dental granuloma. *J Dent Res.* 1934;14(4):297-301.

Braga MM, Martignon S, Ekstrand KR, Ricketts DN, Imparato JC, Mendes FM. Parameters associated with active caries lesions assessed by two different visual scoring systems on occlusal surfaces of primary molars a multilevel approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(6):549-58.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde. 2004.

Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J Endod.* 1981;7:378-80.

Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol.* 1991;6(2):123-5.

Brook I. Microbiology and management of endodontic infections in children. *J Clin Pediatr Dent.* 2003;28(1):13-7.

Brown JH, Brenn L. A method for the differential staining of Gram-positive and Gram-negative bacteria in tissue sections. *Bull Johns Hopk.* 1931;48:69-73.

Brown LR, Rudolph CE. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pul-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957;10(10):1094-9.

Card SJ, Sigurdsson A, Orstavik D, Trope M. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *J Endod.* 2002;28:(11):779-83.

Chen, CK, Wilson ME. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. *J Periodontol.* 1992;63:941-53.

Cogulu D, Uzel A, Önçag O, Aksoy SC, Eronat C. Detection of *Enterococcus faecalis* in Necrotic Teeth Root Canals by Culture and Polymerase Chain Reaction Methods. *Eur J Dent.* 2007;1(4):216-21.

Cogulu D, Uzel A, Önçag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008a;106(3):443-9.

Cogulu D, Uzel A, Önçag O, Aksoy C, Eronat C. Evaluation of Antibiotic Susceptibility of *Enterococcus faecalis* Isolated from deciduous and permanent tooth root canals. *J Hacettepe Faculty of Dentistry.* 2008b;32(2):39-44.

Cohen MM, Jores SM, Calisti LP. Bacteriologic study of infected deciduous molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1960;13:382-6.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-Regeneration Interplay in the Dentine-Pulp Complex. *J Dent.* 2010;38(9):687-97.

Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod.* 1997;23:433-8.

Cuoghi AO, Bertoz FA, de Mendonca MR, Santos EC. Loss of space and dental arch length after the loss of the lower first primary molar: a longitudinal study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry.* 1998;22:117-20.

Doan N, Contreras A, Flynn J, Slots J, Chen C. Molecular Identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3043-7.

Dunston B, Coll JA. A survey of primary tooth pulp therapy as taught in US dental schools and practiced by diplomates of the American Board Of Pediatric Dentistry. *Pediatr Dent.* 2008;30:42-8.

Edwards S, Nord CE. Identification and characterization of micro-organisms isolated from infected primary teeth. *J Int Assoc Dent Child*. 1972;3(1):15-8.

Engstrom B, Frostell G. Experiences of Bacteriological Root Canal Control. *Acta Odontol Scand*. 1964;22:43-69.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002;35:221-8.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller ÅJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res*. 1982;90:200-6.

Fabris AS, DiRienzo JM, Wikstrom M, Mayer MP. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(4):231-8.

Fanning EA. The relationship of dental caries and root resorption of deciduous molars. *Arch. oral Biol*. 1962;7:595-601.

Faria G, Nelson-Filho P, de Freitas AC, Assed S, Ito IY. Antibacterial effect of root canal preparation and calcium hydroxide paste (Calen) intracanal dressing in primary teeth with apical periodontitis. *J. Appl. Oral Sci*. 2005;13(4):351-5.

Fouad, AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3223-31.

Gharbia SE, Haapasalo M, Shah H, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol*. 1994;65:56-61.

Godoy VL de. Distribuição de bactérias planctônicas, colônias bacterianas e biofilmes microbianos em dentes decíduos com pulpite e ou necrose pulpar. [tese (Doutorado em Odontopediatria)]. Bauru, SP: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 1999.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(2):247-53.

Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini AL, Felis GE, Sechi LA, Franco BD, De Martinis EC. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiol. 2008;25(5):668-75.

Grenier, D. Collagen-binding activity of *Prevotella intermedia* measured by a microtitre plate adherence assay. Microbiol. 1996;142:1537-41.

Gorski JP, Marks Jr. SC. Current concepts of the biology of tooth eruption. Crit Rev Oral Biol Med. 1992;3(3):185-206.

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91(5):579-86.

Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. E J Oral Sci. 2007;49(1):1-12.

Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J Endod. 1992;18(11):558-61.

Hobson P. Pulp treatment of deciduous teeth. Part 1 - Factors affecting diagnosis and treatment. Br Dent J. 1970;128:232-8.

Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FGC, Almeida GC, Gomes BPFA. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. J Endod. 2008;34:1451-6.

Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. J Endod. 2006;32(10):946-50.

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

Kantz WE, Henry CA. Incidence of *Streptococcus mutans* in root canals. *J Dent Res.* 1973;52(5):1163.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:308-20.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3497-503.

Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. *J Endod.* 1976;2(5):146-8.

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

Kishen A, Sum C, Mathew S, Lim C. Influence of Irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod.* 2008;34:850-4.

Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71(5):603-11.

Linde A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res.* 1985; 64:523-9.

MacDonald JB, Hare GC, Wood, AW. The bacteriologic status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957;10(3):318-22.

Marsh SJ, Largent MD. A bacteriological study of the pulp canals of infected primary molars. *ASDC J Dent Child.* 1967;34:460-9.

Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Weiss EI. Enhanced attachment of *Porphyromonas gingivalis* to human fibroblasts mediated by *Fusobacterium nucleatum*. J Endod. 2009;35:82-5.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. Dent. Cosmos. 1894;36(7):505-28.

Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. Aust Endod J. 2009;35(3):131-9.

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. Odontol Tidskr. 1966;74(5 Suppl):1-380.

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect Immun. 1985; 48(2):507-19.

Morabito A, Defabianis P. A SEM investigation on pulpal-periodontal connections in primary teeth. ASDC J Dent Child. 1992;59:53-7.

Moss SJ, Addelston H, Goldsmith ED. Histologic Study of Pulpal Floor of deciduous molars. J Am Dent Assoc. 1965;70:372-9.

Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. J Endod. 1995;21(2):70-3.

Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J. Endod. 1987;13(1):29-39.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990; 16(12):580-8.

Naito Y, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. Dent Res. 1988;67(8):1075-80.

Nandakumar R, Mirchandani R, Fouad A. Primer sensitivity: can it influence the results in *Enterococcus faecalis* prevalence studies? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:429-32.

Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. Int Endod J. 1994;27(4):218-22.

Önçag O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. Int Endod J. 2003; 36(6):423-32.

Önçag O, Cogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: an in vivo study. J Clin Pediatr Dent. 2006; 30(3):233-7.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdogaan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. J Appl Oral Sci. 2009;17(5):370-4.

Paster BJ, Olsen I, Ass JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontology 2000. 2006;42:80-87.

Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. Pesqui Odontol Bras. 2003;17(4):367-71.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000; 26(10):593-5.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001; 34(6):429-34.

Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. New Microbiol. 2008;Apr;31(2):235-40.



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

Queiroz AM, Nelson-Filho P, Silva LA, Assed S, Silva RA, Ito IY. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. *Braz Dent J*. 2009; 20(4):290-6.

Rayner JA, Southam JC. Pulp changes in deciduous teeth associated with deep carious dentine. *J Dent*. 1979;7(1):39-42

Reisine ST, Psoter W. Socioeconomic status and selected behavioral determinants as risk factors for dental caries. *J Dent Educ*. 2001;65:1009-16.

Reddy S, Ramakrishna Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: A microbiological study. *J Clin Pediatr Dent*. 2007;31:193-98.

Reeves R, Stanley HR. The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966;22(1):59-65.

Rimondini L, Baroni C. Morphologic criteria for root canal treatment of primary molars undergoing resorption. *Endod. dent. Traumat*. 1995;11(3):136-41.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J*. 2003;36(1):20-6.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004;30(5):315-20.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Culture-Independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic Infections. *J Endod*. 2006a;32:509-512.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of *Dialister* species in Infected root canals. *J Endod*. 2006b;32:1057-61.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in primary endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):474-8.

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, da Silva LAB. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008;41(8):664-9.

Ruvière DB, Leonardo MR, da Silva, LAB, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child.* 2007;74(2):118-23.

Saito Y, Fujii R, Nakagawa K, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:1-6.

Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *Int J Pediatr Dent.* 2007;17(3):192-9.

Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microbial Ecology in Health Disease.* 1993;6(6): 269–75.

Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005;38(10):735-42

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006;32:104-9.

Shovelton DS. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *Br Dent J.* 1964;117(3):101-7.

Shovelton DS. A study of deep carious dentine. *Int Dent J.* 1968;18(2):392-405.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J*. 2006; 17:144-8.

Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996;22(6):308-10.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Santos KRN. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15:335-337.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA directed PCR. *J Endod*. 2001;27:164-7.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2):174-8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic Infections as detected by nested PCR. *J Endod*. 2003a;29(4):244-7.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. *Int Endod J*. 2003b;36:174-180.

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

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-1301.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Re*. 2009;88(11):969-81.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997;30:297-306.

Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 1995;20(Suppl 2):S304-7.

Sobrinho AP, Barros MH, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM, Bamber EA, Bahia MG, Vieira EC. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. J Endod. 1998;24:405-8.

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored rare biosphere. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:12115-20.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006; 32(2):93-8.

Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J Endod. 1989;15:13-19.

Sundqvist G. Association between microbial species in dental root canal infections. Oral microbiol. Immunol. 1992;7:257-62.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78:522-30.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998;85:86-93.

Thilander B. Dentoalveolar development in subjects with normal occlusion. A longitudinal study between the ages of 5 and 31 years. Eur J Orthod. 2009;31(2): 109-20.

Thomas AM, Chandra S, Chandra S, Pandey RK. Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: a short-term study using iodoform paste. J Endod. 1994;20(5):233-5.

Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens*

in chronic endodontic infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:285-8.

Tomić-Karović K, Jelinek E. Comparative study of the bacterial flora in the surroundings, the root canals and sockets of deciduous molars. Int Dent J. 1971; 21:375-88.

Toyoshima Y, Fukushima H, Inoue JI, Sasaki Y, Yamamoto K, Katao H, Ozaki K, Moritani Y, Saito T, Hieda T. A bacteriological study of periapical pathosis on deciduous teeth. Shoni Shikagaku Zasshi. 1988;26:49-58.

Tronstad L, Kreshtool D, Barnett, F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. Endod Dent Traumat. 1990;6(3):129-36.

van Winkelhoff AJ, Kippuw N, De Graaff J. Cross-inhibition between black-pigmented *Bacteroides* species. J Dent Res. 1987;66:1663-7.

van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJM, De Graaff J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: its role in endodontal infections. J Endod. 1992;18:431-4.

Vermot-Gaud M. Evidences and statistical studies on the incidence of pulp-periodontal canals of deciduous molars and their relation to interradicular septum infection. Rev Fr Odontostomatol. 1967;14(9):1487-504.

Vidana R, Sullivan A, Billström H, Ahlquist M, Lund B. Enterococcus faecalis infection in root canals - host-derived or exogenous source? Lett Appl Microbiol. 2011; 52(2):109-15.

Wang X, Yang P, Yu Y. The study of histopathology and bacteriology of coronal pulp tissue in deciduous teeth with deep dentin caries. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2000;35(5):365-7.

Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. J. Endod. 1992;18(4):152-5.

Winkler TF 3<sup>rd</sup>, Mitchell DF, Healey HJ. Bacterial study of human periapical pathosis employing a modified Gram tissue stain Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1972;34(1):109-16.

Winter GB. Abscess formation in connexion with deciduous molar teeth. Arch Oral Biol. 1962;7:373-9.

Wittgow W, Sabiston CB. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. J Endod. 1975;1(5):168-71.

Yang QB, Fan LN, Shi Q. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequence analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in children. J Endod. 2010;36(2):218-23.