

REGINA CÉLIA FURUKAVA SHIN

**Estudo crítico dos métodos moleculares utilizando iniciadores universais na
identificação da microbiota endodôntica e da desinfecção
do sistema de canais radiculares**

São Paulo

2012

REGINA CÉLIA FURUKAVA SHIN

**Estudo crítico dos métodos moleculares utilizando iniciadores universais na
identificação da microbiota endodôntica e da desinfecção
do sistema de canais radiculares**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

São Paulo

2012

Shin RCF. Estudo crítico dos métodos moleculares utilizando iniciadores universais na identificação da microbiota endodôntica e da desinfecção do sistema de canais radiculares. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico e agradeço a Deus

Por todas as graças concedidas,

Por ter me permitido viver essa fase em minha vida com grande alegria e muito trabalho,

Por me dar forças todas as vezes que necessitei,

Por me consolar nas tristezas e dificuldades, que foram muitas...

Por me presentear com grandes amizades, nas quais guardarei para sempre em meu coração, como tesouro mais precioso,

Por permitir finalizar mais uma etapa em minha vida

“Nada na vida acontece por um acaso, e se aconteceu DEUS quis assim. O que me resta é só correr atrás de meus objetivos, ainda mesmo que pessoas conpirem ao contrário. DEUS estará comigo.”

Eça de Queiroz

Dedico aos meus pais *Yosímitu e Célia*.

Pela minha existência e educação, tenho certeza que o que sou hoje devo tudo a vocês, pai exemplo que sigo, eu o admiro muito e espero um dia chegar aos seus pés, minha querida mãe desejo a sua presença em minha vida com seus conselhos e palavras amigas, no qual sinto muita falta.

Dedico ao meu amado *Lucas*, marido, companheiro, alicerce, base de tudo, pai de meus filhos.

Por ter me acompanhado nessa jornada e suportado todos esses anos, onde a minha ausência foi algo muito grande e sentida, pela grande paciência em meus momentos de muita ansiedade, pelas palavras de consolo em todas as minhas dificuldades, pela preocupação sentida em minhas inúmeras idas à Faculdade pelo apoio a mim dado para realizar esse grande feito, pelas palavras amigas que ouvi nos piores momentos vividos e que se não fosse por isso não teria suportado. Eu te amo muito!

Dedico aos meus lindos filhos *Catarina, Filipe, Renata, Víctor, Sophía, Paula, Fernanda e Isadora.*

Por todo apoio recebido, por todo carinho dado, pela existência de cada um de vocês e amor a mim mostrado, pela grande ajuda em não demonstrar a tristeza que sentiam quando a mamãe saía para trabalhar, até colinho ganhei de vocês, eu sei que minha ausência foi vivida de uma maneira diferente para cada um e essa vitória eu ofereço para meus queridos filhos. Cada um de vocês é um pequeno universo que me faz a pessoa mais feliz do mundo!

Dedico ao meu irmão *Alexandre*

Pelo apoio que recebi nas horas mais críticas e difíceis em minha vida, pelos conselhos que recebi e por ser meu irmãozinho caçula...

Dedico a minha prima *Cristina*

Por me ajudar muito, com a minha ausência, você foi a mãezinha de meus filhos, a irmã do coração e amiga não sei como retribuir tanta gentileza.

Dedico as minhas irmãs *Vera e Luciana*

Que apesar da distância, moram em meu coração...

"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família."

Léon Tolstoi

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor *Manoel Eduardo de Lima Machado* Pela oportunidade de me acolher e permitir ingressar nesse universo maravilhoso que é a Ciência, por me ensinar a lidar com as dificuldades com sabedoria, por ter tido paciência com minha ignorância, pela amizade nesses anos todos em que eu o conheço.

Agradeço ao Professor Doutor *Giulio Gavini*, sempre solícito, por toda ajuda dispensada e que foi crucial para o começo do trabalho. Tenho grande admiração pelo senhor.

Agradeço ao Professor Doutor *Arlindo Di Spagna Souza* por fazer parte de minha vida acadêmica e ser meu grande inspirador nessa carreira, além de ser um grande amigo.

Agradeço a pós-doutoranda *Lília Alves Rocha* que com sua sabedoria imensa me ajudou muito na realização e finalização do trabalho e sei que se não fosse você, minha amiga antes de tudo, não teria conseguido mesmo! Por aguentar a minha ansiedade, que foram muitas. Pelos conselhos que me destes e que guardarei para sempre. Por ter tido paciência com a minha ignorância obrigada, obrigada, obrigada, não há palavras para demonstrar meu agradecimento.

Agradeço aos Professores Doutores do Departamento de Dentística *Marcelo dos Santos* e *Carlos Eduardo Aun* pela agradável convivência nesses anos todos.

Agradeço a Professora Doutora *Silvana Cai*, do departamento de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos obtidos na microbiologia, fundamental para qualquer pesquisador, e pela sua grande amizade e convivência.

Agradeço aos colegas de pós-graduação, especialmente o *Cleber*, pela sua amizade, pelos conselhos que você me deu e que foram muito importantes para mim, *Gustavo, Felipe, Leandro, Rodrigo, Elaine, Laíla, Vitor, Ceci, Nilton, Símony* pela amizade construída nesses anos todos, pela companhia agradável que pude conviver nas aulas, corredores, almoços, cafés, encontros, festas e congressos.

Agradeço a *Soninha* por sua presteza em me ajudar todas as vezes que precisei e sempre com um sorriso no rosto, *Débora* e *Aldo* também agradeço por tudo que vocês fizeram nesses anos todos!

Agradeço as secretárias do departamento *Ana Maria, Selma* e os meninos *Leandro* e *Davi*, por tudo que vocês fizeram por mim. Obrigada!

Agradeço as meninas da biblioteca *Glauci, Cláudia*, pela presteza com que me atenderam e me ajudaram muito. Obrigada!

Agradeço a minha colega de trabalho, amiga para todas as horas *Márcia* que me apoiou em momentos terríveis, me deu conselhos valiosíssimos e me ajudou com a sua presença quando não pude estar presente em várias ocasiões.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, *Matheus Ferrari* e *André Fiuza*, que com suas amizades me inspiraram a continuar nessa longa jornada. Obrigada meninos por tudo! Adoro vocês.

Agradeço a *Maria* pelas suas palavras de carinho e pela sua amizade que esteve presente nesses anos todos.

Agradeço aos *alunos do Curso de Especialização do HMASP* tão queridos e alegres que me acompanharam nessa grande jornada, a todos que passaram durante este período, cada um com seu jeito me inspiraram para aprender mais e mais e poder passar a frente todos os conhecimentos recebidos.

E por fim pensaram que esqueci? De jeito nenhum...

O curso de Mestrado só valeu, pois conheci vocês dois:

George e Mário

Agradeço do fundo do meu coração

Aos meus queridos amigos, irmãos. Pela amizade cultivada, pelos conselhos e palavras amigas que escutei e tentei seguir, pelo apoio em todos os momentos difíceis, pelos conhecimentos que vocês me passaram, pela companhia agradável em várias ocasiões, pelas risadas compartilhadas, pelas dificuldades vividas e que se tornaram mais leves, vocês dois são muito especiais para mim, vou levar para sempre em meu coração, nunca vou esquecer-me de vocês. Por tudo!

“Nunca estamos sós, é verdade. É bom saber que temos amigos em quem podemos confiar. Pessoas que nos apoiam e nos acolhem com tanto carinho. É certo que tenho passado momentos muito difíceis. E comigo estão sempre os amigos, dando-me palavras de conforto e ânimo. Sou grata a Deus por ter conhecido tantas pessoas boas, de coração aberto e firme. Quero agradecer a vocês por tudo. Em especial por estarem ao meu lado, sempre. Saiba que eu também quero fazer por vocês o que for possível. Disponha da minha amizade sincera. Meu eterno agradecimento.”

Autor Desconhecido

"Há homens que lutam um dia e são bons. Há outros que lutam um ano e são melhores. Há os que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, há os que lutam toda a vida. Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

Augusto Cury

RESUMO

Shin RCF. Estudo crítico dos métodos moleculares utilizando iniciadores universais na identificação da microbiota endodôntica e da desinfecção do sistema de canais radiculares [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão corrigida.

No sentido de colaborar com o estudo da redução de microrganismos em Endodontia, foi realizada uma análise crítica dos modelos metodológicos *in vivo* sobre as técnicas moleculares utilizadas na avaliação da microbiota endodôntica e na capacidade de medir a antissepsia que o tratamento endodôntico proporciona. Desta maneira, os trabalhos foram agrupados de acordo com a proposta do presente estudo. Na análise crítica e comparativa, pode-se observar uma grande variedade de métodos moleculares aplicados nos estudos, sendo que o mais utilizado nos ensaios para avaliação da microbiota foi o PCR. Havia estudos que utilizavam uma combinação de vários métodos onde foi possível identificar microrganismos ainda não conhecidos. Nos ensaios que utilizam iniciadores universais e que se valem da identificação de microrganismos através do DNA, foram listados de maneira a poder observar que o iniciador universal formado pela seguinte cadeia de oligonucleotídeos: F: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'/R: 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' foi o mais descrito pela literatura.

Palavras-chave: Terapia endodôntica. Identificação bacteriana. Métodos moleculares. Antissepsia.

ABSTRACT

Shin RCF. Critical study of the molecular methods using universal primers for the identification of endodontic microbiota and disinfection the root canal system [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão corrigida.

In order to collaborate with the study of disinfection in Endodontics, was performed a study of critical methodological models *in vivo* on the molecular techniques used in the evaluation of endodontic microbiota and the ability to measure the disinfection capacity of endodontic treatment. Thus, the studies were grouped according to the purpose of this study. Under in critical and comparative analysis it's can be seen a wide variety of molecular techniques used in the studies, and as used in the tests was to evaluate the microbial PCR studies using a combination of various methods which could be identified microorganisms has not known. In assays using universal primers which rely on the identification of microorganisms using the DNA, were listed as to be able to observe that the universal primer chain formed by the following primers: F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' / R: 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' was as described in the literature.

Keywords: Endodontic therapy. Bacterial identification. Molecular methods. Disinfection.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Estudos de identificação da microbiota nos sistemas de canais radiculares infectados	44
Tabela 5.2 - Estudos analisando a capacidade de redução bacteriana após o preparo químico cirúrgico	50
Tabela 5.3 - Iniciadores universais mais utilizados em estudos <i>in vivo</i> analisando a microbiota e antissepsia dos canais radiculares	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CHX	Diclugonato de clorexidina
cDNA	Desoxirribonucleic acid complementary
DNA	Desoxirribonucleic acid
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDTA-T	Ácido etilenodiamino tetra-acético tergentol
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LAL	Lisado de amebócito limulus
mL	Mililitro
n	Número de amostras
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PCR	Polimerase chain reaction
PQC	Preparo químico cirúrgico
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
qPCR	Polimerase chain reaction real time
RNA	Ribonucleic acid
RT- PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
Pb	Pares de base
Sp	Espécie
TBE	Gel de agarose
UE/ml	Unidade de endotoxina por mililitro
UFC/ml	Unidade formadora de colônia por mililitro
BVNC	Bactéria viável não cultivável

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Estudos <i>in vivo</i> avaliando a diversidade da microbiota	17
2.2 Estudos <i>in vivo</i> avaliando o grau de redução microbiana após preparo químico-cirúrgico e/ou após uso da medicação intra- canal	32
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
5 RESULTADOS	43
6-DISCUSSÃO	55
7-CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	64

1 INTRODUÇÃO

A antissepsia constitui na grande maioria das vezes o caminho para sucesso da Endodontia. Neste particular, experimentos que são realizados para verificar a eficiência de uma ou outra técnica são extremamente esclarecedores, mas um ponto é levado em consideração: a metodologia utilizada é viável? As condições do experimento podem ser repetidas? Trabalhos *in vitro* são mais importantes do que trabalhos *in vivo*? Neste particular entendemos que os resultados científicos devem ser interpretados com limitações e os resultados clínicos observados.

Ainda que os avanços nos métodos de biologia molecular não levem a uma mudança significativa no conhecimento da microbiota do sistema de canais radiculares, eles certamente auxiliarão na melhor compressão da microflora presente, sendo muitas vezes fundamental para o estabelecimento de estratégias inteligentes no combate à infecção.

Na Endodontia, estudos devem ser realizados com a proposta de contribuir com o conhecimento da microbiota dos sistemas de canais radiculares e métodos a serem empregados nos ensaios de quantificação bacterianos vinculados a diferentes etapas da antissepsia, tais como o preparo químico mecânico do canal radicular. Neste particular uma revisão esclarecedora sobre métodos moleculares empregados para este fim, é fundamental, pois tais procedimentos permitem a quantificação da carga bacteriana antes e após o tratamento endodôntico, demonstrando assim sua possível redução. Como exemplo os métodos de PCR (reação em cadeia da polimerase) que permite detectar presença bacteriana através da identificação do DNA e apresentam uma alta especificidade e sensibilidade quando comparado aos métodos de cultura (Rolph et al., 2001; Gomes et al., 2006a; Sedgley et al., 2006a; Sedgley et al., 2006b; Williams et al., 2006; Saito et al., 2009). Outros métodos moleculares utilizados nos estudos são: os derivados de ensaios de PCR- Nested PCR (nPCR) que utiliza o produto de amplificação por PCR numa segunda reação de PCR proporcionando uma alta sensibilidade; PCR transcriptase reversa (RT-PCR) amplificam alvos de RNA e exploram a utilização da enzima transcriptase reversa e que pode sintetizar uma fita de DNA complementar (cDNA) a partir de um molde de RNA, este método permite identificar bactérias em seu estado viável; uma evolução no método de PCR é o qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo

real) que detecta e quantifica através da fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação permitindo a leitura em menor tempo em relação aos métodos tradicionais; outro método bastante utilizado na identificação microbiana é o sequenciamento dos produtos do PCR, os produtos de PCR são clonados num vetor de plasmídeo, que é usado para transformar células de *Escherichia coli*, estabelecendo uma biblioteca do 16S rDNA bacteriano da amostra e que permite verificar diversas espécies bacterianas de uma vez; outro método que permite a identificação de várias espécies é baseado em sondas de oligonucleótidos sobre um suporte de membrana denominado método de hibridização checkerboard DNA-DNA que após a fixação das amostras na membrana, é possível verificar a presença simultânea de um grande número de espécies bacterianas em uma única amostra clínica; o método DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), permite através do gel em eletroforese estudar padrões da comunidades bacterianas (Siqueira et al., 2005).

Quando se avalia microrganismos pelo método de PCR é necessário conhecermos a sequência do DNA, esta cadeia é composta por nucleotídeos, que uma vez identificada pode ser reproduzida e sintetizada para cada grupo de bactérias, no qual denominamos de iniciadores. Desta forma nas investigações que se utilizam dos iniciadores onde a proposta é identificar espécie-específico ou presença bacteriana, podem apresentar alguns problemas, tais como: a dificuldade de detectar ou cobrir a maioria das espécies encontradas em uma determinada amostra (Nadkarni et al., 2002; Horz et al., 2005), isto é, o iniciador universal que a princípio teria por função detectar a presença de toda e qualquer espécie bacteriana pode muitas vezes, falhar em uma ou outra espécie. Neste contexto é salientada a importância do estudo e indicação dos iniciadores mais descritos na literatura com a revisão em questão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo foram abordadas revisões literárias subdivididas em estudos avaliando a diversidade da microbiota e o grau de redução bacteriano após o preparo químico mecânico e/ou após uso da medicação intra canal.

2.1 Estudos *in vivo* avaliando a diversidade da microbiota

Rolph et al. (2001), avaliaram a diversidade de bactérias presentes em canais radiculares infectados. Foi realizado ensaio de PCR baseado no gene 16S rRNA, seguido por clonagem e sequenciamento do 16S rRNA a partir de um pequeno subconjunto de amostras para avaliar a diversidade de bactérias presentes em canais radiculares infectados. Um total de 41 amostras clínicas a partir de 15 casos com periodontite primária e 26 casos de infecções endodônticas refratárias foi avaliado. Destas amostras, 44% foram positivas pela cultura e 68% foram positivas por PCR. Oito amostras foram seleccionadas para posterior análise. Destes, os dois casos de periodontite primária renderam sequências relacionadas com as do *Enterococcus* gêneros *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* e dois clones foram relacionados com bactérias anteriormente não cultivadas, enquanto que o caso associado com fístula em periodontite primária rendeu sequências relacionadas com as do gênero *Lactobacillus*, *Pantoea*, *Prevotella*, e *Selenomonas*. Os cinco casos refratários produziram clones que foram relacionados com gêneros, *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, e *Veillonella* e dois clones representando anteriormente bactérias não cultiváveis. As posições filogenéticas de vários clones associados com o *Clostridiaceae* e subgrupos *Sporomusa* do agrupamento *Firmicutes* são também mostrados. Este estudo demonstrou que as técnicas moleculares proporcionam identificação mais ampla de espécies bacterianas em infecções endodônticas, incluindo a presença de bactérias ainda não identificadas

ou não cultiváveis, enquanto que técnicas de cultura produzem resultados negativos para determinadas espécies.

A concepção e avaliação de um conjunto de iniciadores universais e sondas para a amplificação do 16S rDNA de domínio bactéria para estimar a carga bacteriana total por PCR em tempo real (qPCR) é relatado por Nadkarni et al. (2002). Uma ampla especificidade do sistema universal de detecção foi confirmada por testes de DNA isolados a partir de 34 espécies bacterianas, englobando a maioria dos grupos de bactérias descritos no manual Bacteriologia de Bergey. No entanto, a natureza do DNA cromossômico usado como padrão era crítica. Um padrão de DNA representando as bactérias mais prováveis a predominarem um determinado habitat era importante para uma determinação mais precisa da carga bacteriana total devido a variações no 16S rDNA, número de cópias e o efeito do tempo de geração das bactérias sobre este número, uma vez que o crescimento rápido pode resultar em replicação múltiplas e, portanto, em efeito, mais do que uma cópia de porções do cromossomo. A validade para estimar essa carga bacteriana foi confirmada pelo número de bactérias numa amostra artificial *in vitro* e misturado em amostras clínicas de dentina cariada. Tendo estes parâmetros em consideração, o número de bactérias anaeróbias estimados pelos iniciadores e sondas universais em dentina cariada foi 40 vezes maior do que a carga bacteriana total detectada por métodos de cultura, demonstrando a utilidade do qPCR, na análise deste ambiente.

Fouad et al. (2002) avaliaram 10 supostos patógenos bacterianos em canais radiculares com polpa necrótica. Além disso, as associações de desses microrganismos com sintomas e uma história de diabetes mellitus foram investigados. Amostras microbiológicas a partir dos canais de 24 dentes com polpa necrótica foram incluídas no estudo. PCR com iniciadores universal identificando DNA bacteriano em 22 espécimes; os restantes 2 espécimes foram de dentes intactos que tinham sido traumatizados 6 meses antes do tratamento. PCR com iniciadores específicos mostraram que os sintomas pré-operatórios foram significativamente associados com a presença de *Streptococcus* spp. ($P < 0,001$ pelo teste do qui-quadrado). Havia tendência não significativa para sintomatologia estar associada ao *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* e para a diabetes mellitus estar associado com *P. gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Clonagem e sequenciamento do produto de PCR universal em uma amostra revelou

a presença de um organismo relacionado com género *Olsenella*, que não tinha sido descrito previamente em infecções endodônticas.

Siqueira et al. (2003) detectaram através da reação em cadeia da polimerase baseado no 16S rDNA, o *Peptostreptococcus micros* em canais radiculares com infecção primária. Amostras foram coletadas de 50 dentes com lesão de cárie, polpa necrótica e diferentes formas de doença periapical. O DNA foi extraído de amostras e amplificado. Foi realizada avaliação em PCR com fragmentos específicos de 16S rDNA da espécie *P. micros* que foi detectado em 6 de 22 (27.3%) em canais associados com lesão periapical crônica assintomático, 2 de 8 (25%), com periodontite apical aguda e 6 de 20 (30%) em casos com abscesso periapical agudo. Em geral, *P. micros* foi encontrado em 14 de 50 casos (28%). Havia uma correlação entre a presença de *P. micros* e a ocorrência de sintomas. Os achados sugeriram que *P. micros* poderia estar envolvido em patogêneses de diferentes formas de lesão periapical.

Siqueira e Rôças (2003a) investigaram a ocorrência de *Campylobacter gracilis* e *C. rectus* em canal radicular com infecção primária. As amostras foram coletadas de 57 dentes unirradiculares com lesões de cárie, polpas necróticas e evidência radiográfica de doença perirradicular. Vinte e oito casos foram diagnosticados como lesões perirradiculares crônicos assintomáticos, 12 casos como periodontite apical aguda, e 17 casos como abscesso perirradicular agudo. O DNA foi extraído das amostras usando iniciadores universais 16S rDNA. Uma segunda rodada de amplificação usando restos de produtos de PCR foi realizada para detectar especificamente *C. gracilis* ou *C. rectus* nas amostras. *Campylobacter gracilis* e *C. rectus* foram, respectivamente, detectada em 21,4 (6 de 28) e 30% (6 de 20) dos canais radiculares associados a lesões crônica perirradiculares assintomáticos. *Campylobacter gracilis* foi encontrada em 16,7% (2 de 12) dos casos diagnosticada como periodontite apical aguda, enquanto que *C. Rectus* foi encontrada em 33,3% (dois dos seis casos). Nos casos abscedados, *C. gracilis* e *C. rectus* foram detectados em 23,5 (4 de 17) e 11,8% (2 de 17) dos casos, respectivamente. Nenhuma associação destas espécies com sintomas clínicos foi observada ($P > 0,01$). Em geral, a identificação de espécies-específico com PCR permitiu a detecção de *C. Gracilis* em 21,1% (12 de 57) e *C. rectus* em 23,3% (10 de 43) das amostras colhidas a partir de infecções endodônticas primárias. Os resultados afirmam de que tanto *C. gracilis* e *C. rectus* participam em infecções de

origem endodôntica e sugerem um papel patogênico com relação às doenças perirradiculares.

Siqueira e Rôças (2003b) investigaram a ocorrência de quatro *treponemas*: *Treponema maltophilum*, *Treponema lecithinolyticum*, *Treponema amylovorum*, e *Treponema medium* em casos de infecção endodôntica primária associados com diferentes formas de doença periapical através da PCR Nested (nPCR) baseado no 16S rDNA. Amostras foram tiradas de 31 canais radiculares infectados com associação de periodontite assintomática e sintomática. DNA foi extraído das amostras e inicialmente amplificado utilizando iniciador universal 16S rDNA, seguido por uma segunda amplificação por PCR usando o primeiro produtos para detectar um fragmento específico do 16S rDNA de cada alvo espécie de *treponema*. Todos os casos foram positivos para os iniciadores universais bacterianos, indicando que as amostras continham DNA bacteriano. Das quatro espécies alvo, *T. maltophilum* foi o mais prevalente, sendo detectada em 39% dos casos (33% dos casos assintomáticos e 50% dos casos sintomáticos). *T. lecithinolyticum* foi a seguinte mais prevalente entre as espécies testadas, sendo encontrada em 26% das amostras (33% casos assintomáticos e 10% dos casos sintomáticos). *T. amylovorum* foi encontrada em 7% dos casos (5% dos casos assintomáticos e 10% dos casos sintomáticos), enquanto *T. médium* foi em 13% dos casos (14% dos casos assintomáticos e 10% de casos sintomáticos). Nenhuma das espécies testadas foi significativamente associada com os sintomas clínicos. Este foi possivelmente o primeiro estudo até agora a relatar a ocorrência de *T. lecithinolyticum*, *T. amylovorum* e *T. médium* em infecções de origem endodôntica. Em geral, os resultados sugeriram que estes *treponemas* orais, particularmente *T. maltophilum* e *T. lecithinolyticum*, pode estar envolvida na patogênese de doenças perirradiculares.

Os mesmos autores destacam a ocorrência de várias espécies microbianas em casos de falha endodôntica por meio da PCR, Siqueira-Jr e Rôças (2004a). Amostras dos canais radiculares foram retiradas de 22 raízes com canais obturados e com lesões perirradiculares persistentes selecionados para retratamento. O DNA foi extraído a partir das amostras e analisadas para a presença de 19 taxa microbiana, utilizando a reação em cadeia da polimerase. Todas as amostras foram positivas para pelo menos uma das espécies microbiana alvo. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente em 77% dos casos. As outras espécies mais prevalentes foram *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium*

propionicum (52%), *Dialister pneumosintes* (48%), e *Filifactor alocis* (48%). *Cândida albicans* foi encontrada em 9% das amostras. O número médio de espécies em amostras de canais obturados até 2 mm do ápice radiográfico foi de 3, enquanto os casos em que a obturação maior do que 2 mm a partir do vértice rendeu uma média de 5 espécies. Esta diferença foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que os microrganismos ocorrem em todos os casos de dentes obturados associados com lesões perirradiculares, e afirmaram que as falhas do tratamento são de etiologia infecciosa persistente, causada por infecções secundárias intraradiculares. *E faecalis* foi a espécie mais prevalente seguida por outras 4 espécies anaeróbias: *P alactolyticus*, *P propionicum*, *D pneumosintes*, e *F alocis*. Todas as amostras examinadas nutria pelo menos um dos seguintes espécies bacterianas gram-positivas: *E faecalis*, *P alactolyticus*, ou *P propionicum*.

Siqueira-Jr e Rôças (2004b) investigaram a prevalência de *Centipeda periodontii* em infecções endodônticas primárias usando um ensaio espécie-específico de PCR. As amostras foram coletadas a partir de cinquenta dentes com lesões de cárie, polpas necrosadas, e diferentes formas de doenças perirradicular. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado usando primers universais 16S rDNA, e uma segunda rodada de amplificação utilizado o primeiros produtos de PCR para detectar um fragmento específico de *C. periodontii* 16S rDNA. Esta espécie foi detectada em 3 (13%) de 23 casos assintomáticos, em 1 (14%) de 7 casos diagnosticados como periodontite apical aguda, e em 3 (15%) de 20 amostras de pus aspirado a partir de abscessos perirradiculares agudas. Houve associação significativa entre *C. periodontii* e a presença de sintomas clínicos. Em geral, *C. periodontii* foi detectada em 14% dos casos de infecções endodônticas. Este é provavelmente até agora o primeiro estudo para detectar *C. periodontii* em infecções endodônticas primárias. O papel específico desempenhado por estas espécies bacterianas em infecções de origem endodôntica aguarda mais esclarecimentos.

Rôças et al. (2004) avaliaram a ocorrência de nove patógenos endodônticos em canais radiculares em uma população sul-coreana usando uma abordagem molecular independente de cultura. Quatorze canais radiculares com doenças perirradiculares persistentes foram selecionados para o retratamento. Após a remoção da obturação do canal radicular, os canais foram amostrados em um ensaio de PCR. Iniciadores específicos foram utilizados para a detecção microbiana. As bactérias estavam presentes em todos os casos, como revelado por amplificação

usando iniciadores universais 16S rDNA. O táxon mais frequente foi *Enterococcus faecalis* (64%), seguido por *Streptococcus* spp. (21%) e *Tannerella forsythensis* (14%). Os resultados deste estudo usando um método de identificação altamente sensível são coincidentes com os de outros locais usando diversos métodos de identificação em que *E. faecalis* é a principal espécie encontrada em casos de canais radiculares obturados e associados com lesão periapical.

Siqueira e Rôças (2005) em uma revisão de literatura analisaram os principais métodos moleculares que têm sido utilizados ou têm potencial para serem utilizados nos estudos das infecções endodônticas. Além disso, as vantagens e limitações das técnicas moleculares atuais, quando comparados com métodos convencionais para a identificação microbiana também foram discutidos. Trazendo um conjunto significativo de novos conhecimentos no que diz respeito à microbiota oral na saúde e na doença depois do advento das técnicas moleculares.

Kaufman et al. (2005) determinaram se espécies de *Enterococcus* são mais prevalentes em dentes tratados endodonticamente com lesões perirradiculares em comparação com dentes que necessitam de retratamento, mas não apresentaram rarefação periapical. Cinquenta e oito dentes que receberam tratamento de canal com mais de 1 ano e foi exigido reciclagem foram incluídos. Dois endodontistas experientes verificaram a presença ou não de lesão. Extração de DNA e amplificação por PCR foram realizadas utilizando iniciadores universais, bem como específicos de espécies de *Enterococcus*. Os resultados mostraram que a prevalência de bactérias foi de 90% e espécies de *Enterococcus* foi de 12%. Análise estatística revelou uma relação significativa entre a presença de lesão e da presença de bactérias, tal como detectado pelos iniciadores universais ($p=0,032$). Foi encontrada diferença significativa entre os dentes com periápice normal e a presença de espécies de *Enterococcus* ($p= 0,023$). Este estudo revelou que as bactérias são significativamente associadas com insucesso do tratamento endodôntico, mas *Enterococos* não estão associadas com a doença.

Sedgley e Rôças. (2006a) compararam duas técnicas de detecção e quantificação do *E. faecalis*, a cultura microbiológica e PCR. Amostras obtidas de canais com infecção primária e secundária foram colhidas de pacientes da Universidade de Göteborg, Suíça, e analisadas. Encontraram *E. faecalis* em 10,2% e 79,5%, ($p<0,0001$) nas amostras em cultura e PCR respectivamente e 89,6% e 67,5% em infecção secundária e primária respectivamente. Os autores concluíram

que devido a análise com técnicas de PCR *E. faecalis* apresentou maior prevalência do que quando realizado com técnicas de cultura.

Sedgley et al. (2006b) compararam a cultura e qPCR para detectar e quantificar *E. faecalis* na mesma amostra do canal radicular. Amostras foram obtidas a partir do canal principal infeccionado (n= 40) e de dentes que necessitavam de retratamento (n= 48), os casos foram dividido em duas alíquotas iguais, que foram analisados de forma independente a partir da cultura e qPCR. *E. faecalis* foi detectado em 10,2% e 79,5% de amostras pela cultura e pela qPCR, respectivamente ($p < 0,0001$). *E. faecalis* foi detectado mais em retratamento do que nas amostras de infecção primária (89,6% versus 67,5%; $p = 0,01$). O teste com qPCR relatou uma prevalência significativamente maior de *E. faecalis* em amostras endodônticas do que nas técnicas de cultura.

Siqueira e Rôças (2006) examinaram amostras de infecções endodônticas primárias para a presença de *Catonella morbi* e *Granulicatella adiacens*, 2 espécies que foram recentemente sugeridos para ser envolvido com infecções em outros sítios orais. O DNA genômico foi isolado diretamente a partir de amostras tomadas de dentes com diferentes formas de periodontite apical. Foi utilizada ensaio de PCR semi-nested para determinar a prevalência destas 2 espécies-alvo através de iniciadores específicos. Para cada par de iniciador foi confirmado por PCR e por sequenciamento de DNA a partir de amostras positivas representativas. *C morbi* e *G adiacens* foram detectados em 33% e 19%, respectivamente, dos canais associados a periodontite crônica apical; 30% e 10%, respectivamente, dos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, e 16% e 11%, respectivamente, das amostras tiradas de pus em abscessos apicais agudas. Em geral, *C morbi* ocorreu em 26% e *G adiacens* em 14% das amostras colhidas a partir de infecções endodônticas primárias. Os resultados demonstram que *C morbi* e *G adiacens* pode participar da microbiota associada com infecções endodônticas primárias e seu papel específico no processo da doença necessita de maior elucidação.

Gomes et al. (2006a) investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas por cultura e PCR. Amostras microbiológicas foram obtidas a partir de 50 dentes com polpa necrótica não tratada (infecção primária) e de 50 dentes necessitando retratamento (infecção secundária). Técnicas de cultura foram utilizadas, incluindo diluição em série, incubação, e identificação bioquímica. Para a detecção de PCR, as amostras foram analisadas usando um iniciador específico.

Cultura e PCR detectaram espécies em 23 de 100 e 79 de 100 dos dentes, respectivamente. *E faecalis* foi cultivado a partir de 2 (4%) de 50 canais com necrose e de 21 (42%) de 50 que necessitavam retratamento. PCR identificou espécies alvo, em 41 (82%) e 38 (76%) de 50 infecções primárias e secundárias, respectivamente. *E faecalis* foi detectado com maior frequência em dentes com necrose pulpar e nos dentes que necessitavam retratamento quando utilizado o PCR.

Gomes et al. (2006b) investigaram a presença de anaeróbios estritos tais como: *Filifactor alocis*, *Forsythia tannerella*, e *Treponema denticola* em infecções primária e secundária nos canais radiculares com lesões periapicais por meio de análise molecular e a associação destas espécies com sinais e sintomas específicos. Amostras microbiológicas foram coletadas de 100 canais radiculares, 50 com tecido pulpar necrótico (infecção primária), e 50 com tratamento endodôntico fracassado (infecção secundária). O DNA foi extraído a partir das amostras, que foram analisadas para a presença de três agentes patogênicos utilizando iniciadores específicos da espécie por PCR. *F. alocis* foram isolados de 23 canais com infecção primária e 12 canais com infecção secundária; *T. forsythia* de 12 canais com primária e três canais com secundária; *T. denticola* de 19 canais com primária e 12 canais com secundária. Associações sugeridas foram encontradas entre infecção primária e à presença de *F. alocis* e *T. forsythia*. Em particular, foram encontradas associações entre: dor- *F. alocis*; inchaço- *F. alocis*; sensibilidade à percussão- *T. forsythia*; mobilidade- *T. forsythia*, *T. denticola*; canais úmidos- *F. alocis*, *T. forsythia*, *T. denticola*; com exsudato purulento- *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola*; abscesso e *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola* (todos os $p < 0,05$). Os resultados deste estudo indicam que *F. alocis*, *T. Forsythia*, e *T. denticola* parecem estar associados com sinais e sintomas. Além disso, *F. alocis* e *T. forsythia* foram detectados com maior frequência em dentes com necrose pulpar do que em dentes com tratamento endodôntico que necessitavam de retratamento.

Siqueira e Rôças (2007) investigaram a presença e identidade do *Synergistes* em infecções endodônticas primárias usando semi-nested PCR. O DNA genômico foi isolado diretamente a partir de amostras clínicas e utilizados como modelos para a PCR. Amplicons de amostras positivas foram sequenciados e filogeneticamente analisados para determinar a identidade da espécie. No total, cerca de um terço das amostras abrigou bactérias *Synergistes*. Os seguintes foram: filotipos clones orais W028 e W090 BA121/P4G_18 P1, e BH017 e E3_33. Estes resultados

demonstraram que *Synergistes* ainda não cultivadas estão presentes na microbiota endodôntica e um papel na causa de periodontite apical é sugerido e que ainda não foi provado.

Vianna et al. (2007) caracterizaram e quantificaram os filotipos predominantes *Synergistes* em canais radiculares infectados. Foram analisados 32 dentes necróticos, cada um de um paciente diferente, com radiográfica evidência de periodontite apical e com infecções endodônticas primárias. Utilizando qPCR com base em iniciadores específicos de *Synergistes*, sete dos 32 casos foram considerados positivos. A análise da seqüência comparativa mostrou que cada uma das sete amostras foi infectada por um filotipo dominante. A diversidade entre filotipos era tal que eles poderiam ser agrupados em três grandes ramos evolutivos dentro da divisão *Synergistes*. O tamanho da população *Synergistes* total variou de $4,5 \times 10^4$ para $1,5 \times 10^6$ cópias do gene, e a proporção média representou 0,79% da comunidade bacteriana total. Para comparação, também foram quantificado patógenos endodônticos reconhecidos como *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema* e as duas primeiras espécies foram encontradas em cinco de nove casos, respectivamente, com uma proporção média inferior a 0,01%, enquanto *Treponema* foi encontrado em 18 casos com uma proporção média de 1,48%. Assim, a prevalência e quantidade de *Synergistes* estavam claramente dentro do alcance dos outros patógenos analisados, sugerindo sua relevância clínica em infecções endodônticas. Além disso, a diversidade de *Synergistes* encontrados nos canais radiculares infectados como um importante ecossistema humano que fornecem vários micro-nichos únicos para este novo grupo de bactérias.

Siqueira et al. (2007b) identificaram os isolados de bactérias coletadas a partir do canais radiculares de dentes com periodontite apical crônica. Técnicas anaeróbicas foram utilizadas para a cultura; identificação dos isolados foi realizada por PCR e sequenciamento da região V5-V8 do gene 16S rRNA. As bactérias foram encontradas em todas as amostras. O número médio de taxa por canal foi de 3,1 variando de 2 a 8. O número médio de bactérias cultiváveis dos canais radiculares foi de $4,2 \times 10^5$, variando de $2,8 \times 10^3$ para $3,3 \times 10^7$. Oitenta e sete espécies pertencentes a 52 taxas bacteriana foram identificados. As taxas mais prevalentes foram: *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *alactolyticus* *Pseudoramibacter*, *Micromonas micros* e *estreptococos*. Os seguintes filos bacterianos foram representados neste estudo: *Firmicutes* (22 táxons, 46% dos

isolados identificados), *Actinobacteria* (14 táxons, 25,3% dos isolados), *Bacteroidetes* (oito taxa, 13,8% dos isolados), *Fusobactérias* (três táxons, 9,2% dos isolados) e *Proteobactérias* (cinco taxa, 5,7% dos isolados). Em conclusão, os resultados confirmaram a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas primária com dominância de bactérias anaeróbicas. Com o uso de técnicas moleculares as bactérias de difícil identificação foram observadas, incluindo taxas ainda não caracterizadas.

Importante estudo sobre bactérias do complexo vermelho foi realizado por Gomes et al. (2007), onde investigaram a correlação endodôntica entre sinais e sintomas clínicos e a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia* ou sua associação por ensaio PCR. As amostras foram tomadas a partir de 50 casos com a polpa necrótica em infecções primárias. O DNA foi extraído a partir das amostras, que foram analisadas para a presença dos três patógenos endodônticos usando iniciadores espécie-específico. *P. gingivalis*, *T. denticola*, e *T. forsythia* foram detectada em 46%, 38%, e 22% dos casos sintomáticos, respectivamente. O complexo bacteriano composto por *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foi encontrado nos casos com dor espontânea 14%, dor à percussão, inchaço e dor à palpação. A alta prevalência de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* nas amostras examinadas sugere que estas bactérias estão relacionadas com a etiologia de doença perirradicular sintomática.

Cogulu et al. (2007) investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas em dentes decíduos e permanentes por métodos de cultura e PCR. Um total de 145 crianças com idades entre 5 a 13 anos de idade foram envolvidos neste estudo. Entre 145 dentes molares, 57% (n = 83) apresentaram necrose dos tecidos pulpaes e assintomáticos. Métodos de cultura e PCR detectaram espécies em 18 e 22 respectivamente de 83 dentes envolvidos. *E. faecalis* foi cultivado a partir de 8 (18%) de 45 dentes decíduos necróticas e a partir de 10 (26%) de 38 dentes permanentes necróticos. Detecção por PCR identificaram a espécie-alvo, em 10 (22%) e 12 (32%) em decíduos e dentes permanentes necróticos, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa na presença de *E. faecalis* em dentes decíduos e permanente foi encontrada por cultura e métodos de PCR (P = 0,03 e 0,02, respectivamente). A diferença na presença de *E. faecalis* entre dois métodos diferentes não foi estatisticamente significativa (P > 0,05). Os

resultados do presente estudo confirmam que os métodos de cultura e PCR são sensíveis para detectar *E. faecalis* em canais radiculares.

Gomes et al. (2008) investigaram a presença de nove espécies bacterianas em dentes associados com lesões periapicais que apresentavam tratamento endodôntico usando ensaio PCR e correlacionaram espécies com características clínicas dos casos. O DNA foi extraído de 45 amostras de canais tratados com lesões periapicais. Um ensaio de PCR utilizando iniciadores específicos foi utilizado para a detecção de microrganismos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77,8% dos dentes do estudo, seguido por *Peptostreptococcus micros*, detectado em 51,1%. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella Nigrescens* e *Prevotella intermedia*, e foram detectadas em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1%, respectivamente. Além disso, a PCR detectou *Filifactor alocis* em 26,7%, *Treponema denticola* em 24,4%, e *Tannerella forsythia* em 4,4% das amostras. *T. denticola* e *P. micros* foram estatisticamente associados com sensibilidade à percussão ($p < 0,05$). *P. nigrescens* foi associada com a presença de dor espontânea e abscesso ($p < 0,05$). *P. endodontalis* e *P. nigrescens* foram associados com exsudato purulento ($p < 0,05$). Relação sinérgica foi também observada entre algumas espécies. Os resultados deste estudo indicaram que *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada em ensaio por PCR em dentes com falha no tratamento endodôntico.

Sakamoto et al. (2008) determinaram a microbiota de dentes com presença de periodontite apical em canais que já tinham sido tratados usando análise de biblioteca dos genes. As bactérias estavam presentes em todos os casos, confirmando a etiologia infecciosa do pós-tratamento. Setenta e quatro taxas bacterianas pertencente a seis filos foram encontrados em nove casos investigados. Destes, 55% foram identificados como filotipos ainda não cultivado, que também compunham uma parte significativa da microbiota em muitos casos. Vinte e cinco filotipos foram identificados como novos. A maioria dos dentes abrigou uma comunidade mista, com um número médio de 10 taxa por caso. Apenas 11 táxons foram encontrados em mais de um caso, revelando uma alta variabilidade interindividual na composição da microbiota. Os resultados revelaram novos patógenos endodônticos, incluindo bactérias ainda não cultivadas e outras espécies. Concluíram também que *E. faecalis* podem participar nas infecções mistas associados com periodontite apical em pós-tratamento.

Cogulu et al. (2008) avaliaram a presença de agentes patogênicos em amostras selecionadas a partir de canais radiculares de dentes permanentes e decíduos, utilizando o método PCR para determinar a associação desses organismos com sintomas clínicos. Um total de 145 crianças, de 5 a 13 anos de idade, participou deste estudo. A presença de patógenos selecionados (*Actinomyces israelii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythensis*, *Enterococcus faecium*, *Prevotella melaninogenica*) em canais radiculares infectados foi estudada utilizando PCR. A espécie bacteriana *T. denticola* (P= .012, .02) e *E. faecalis* (P= .012, .04) foram altamente associados com radiolucidez periapical e dor, enquanto *P. gingivalis* foi associada com sensibilidade à percussão, tanto decídua como nos dentes permanentes (P= .01, .015). Os resultados do presente estudo confirmam que certas espécies de microorganismos estão associadas com sinais e sintomas clínicos da doença endodôntica em dentes decíduos e permanentes.

Schirrmeister et al. (2009) isolaram e detectaram microrganismos de dentes com tratamento endodôntico associados a lesões periapicais. As bactérias foram caracterizadas por análise morfológica e bioquímicas e pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Microrganismos foram detectados em 10 de 18 dentes. As amostras revelaram uma cultura mista de 2-8 espécies. *Enterococcus faecalis* foram detectados em apenas dois dentes. Pela primeira vez *Vagococcus fluvialis* foi detectado em canais radiculares. *Solobacterium moorei* e *Fusobacterium nucleatum* foram as espécies mais prevalentes. Presença de *F. nucleatum* foi associada com a presença de *S. moorei* em 5 de 7 casos. Em todos os dentes foram encontradas associações de *Parvimonas micra* e *Dialister invisus*, *F. nucleatum* e *S. moorei*. Além disso, membros adicionais de gêneros diferentes foram detectados.

Siqueira et al. (2009) investigaram a ocorrência e os níveis de taxa de diversas bactérias no canal radicular em dentes com periodontite apical. Amostras de DNA foram coletadas da parte apical do canal radicular de dentes extraídos e que apresentavam lesões crônicas perirradiculares e serviram como modelos para análise da presença de 28 espécies bacterianas usando hibridização checkerboard captura reversa. O DNA bacteriano foi detectado em 19 das 20 amostras. Foram detectadas *Pseudoramibacter alactolyticus* (32%), *Bacteroidetes* clone X083 (26%),

espécies de *Streptococcus* (21%), *Olsenella uli* (10,5%), *Synergistes* clone BA121 (10,5%), *Fusobacterium nucleatum* (10,5%), *Porphyromonas endodontalis* (10,5%), *Dialister* clone BS016 (5%), *Filifactor alocis* (5%), *Parvimonas micra* (5%), e *Treponema denticola* (5%). Destes, apenas *Bacteroidetes* clone X083 e *Synergistes* clone BA121 foram encontrados em níveis acima de 10^5 . A ocorrência de táxons de bactérias na parte apical de canais radiculares infectados indica seu potencial papel patogênico na periodontite apical.

Subramanian e Mickel (2009) determinaram a frequência de colonização das bactérias em lesões e caracterizaram a comunidade bacteriana presente em lesões perirradiculares. Trinta e quatro pacientes adultos que apresentaram lesões persistentes e indicadas para apicectomia após terapia endodôntica foram selecionados para o estudo, amostras de tecido perirradicular e raízes seccionadas foram coletados. O total do nível bacteriano foi analisado em 34 pares de amostras em dentes com lesões perirradiculares realizados através da análise de qPCR. Dezesesseis pares dessas amostras foram analisados usando clonagem 16S ribossomal e sequenciamento para a identificação de bactérias. As bactérias foram detectadas de forma mais consistente e maior nos níveis apicais. Lesões perirradiculares exibiram um perfil microbiano diversificado, com muitos filotipos não cultiváveis. *Enterococcus faecalis* e *Burkholderia cepacia* predominaram em ambas as amostras. *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus gordonii* foram associadas com a região apical, enquanto que *Atopobium Rimae*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus* genomospecies C8, *Dialister* sp E2_20 E1, e *Eubacterium* A35MT foram associadas com lesões perirradiculares. As lesões persistentes perirradiculares são infecções polimicrobianas com muitas espécies bacterianas ainda não cultivadas e desconhecidas. Os autores concluíram que a carga bacteriana e o perfil microbiano da região apical são significativamente diferentes do tecido mole na lesão, indicando a presença de diversas populações bacterianas nestes tecidos.

Ozbek et al. (2009) investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias e em tratamentos endodônticos que tiveram falha, utilizando qPCR e determinaram a significância estatística da presença de *E. faecalis* em um população turca com infecções endodônticas. *E. faecalis* foi investigada a partir de 79 amostras microbianas coletada de pacientes que foram tratados na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de

Ataturk (Erzurum, Turquia). Amostras microbiológicas foram coletadas de 43 pacientes (grupo 1) que tiveram insucesso nos tratamentos endodônticos e 36 pacientes (grupo 2) com periodontite apical (infecções endodônticas primárias). O DNA foi extraído usando um mini-kit QIAamp® e o marcador molecular utilizado foi o SYBR Green que é um corante usado para quantificação de DNA em métodos de qPCR. *E. faecalis* foi detectada em 41 de 79 pacientes, sugerindo que não existe nada menos do que 61% de todas as infecções endodônticas quando o teste de proporção ($z = -1,645$, $<x = 0,05$) foi aplicado. Foi detectado *E. faecalis* em 32 de 43 (74,4%) no grupo 1, e em 9 de 36 (25%) no Grupo 2. Estes resultados sugerem que *E. faecalis* é uma bactéria freqüentemente isolada em infecções endodônticas em pacientes turcos, e está mais freqüentemente associada com tratamentos endodônticos que falharam do que nas infecções endodônticas primárias.

Saito et al. (2009) avaliaram através de técnica quantitativa a presença das bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* em infecções endodônticas primárias utilizando qPCR com base em um único marcador molecular. Foi analisado um total de 32 casos sintomáticos ($n=14$) e assintomáticos ($n = 18$). Amostras dos canais radiculares foram coletadas e DNA genômico foi extraído e submetido para qPCR utilizando SYBR Green. Em geral, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e a coexistência de ambas as espécies foram encontradas em 28%, 66%, e 22% respectivamente. Níveis de *P. gingivalis* e *T. forsythia* variou de 5.65×10^6 para 1.20×10^2 e a partir de 5.76×10^6 a 1.35×10^1 . *T. forsythia* foi altamente prevalente e numeroso, enquanto *P. gingivalis* foi moderadamente frequente e menos abundante, mostrando níveis médios 19 vezes menores que o primeiro. Os níveis de *P. gingivalis* e *T. forsythia*, individualmente ou em conjunto, não apresentaram significativa associação com manifestação de dor de origem endodôntica.

Os microrganismos são capazes de sobreviver e induzir infecção persistente nos tecidos periapicais, Fujii et al. (2009) investigaram sob este aspecto a composição da microflora de lesões periapicais secundárias. Vinte amostras de lesões apicais foram obtidas de 20 pacientes com periodontite apical crônica por cirurgia paraendodôntica e analisados por cultura aeróbia ou anaeróbia. Todas as cepas isoladas foram identificadas por análise de sequenciamento do gene 16S do DNA ribossômico. Setenta e quatro cepas foram isoladas, pertencentes a 31 espécies bacterianas obtidas a partir dos 20 lesões apicais que foram isoladas. A maioria das espécies foram anaeróbios facultativos (51,6%). *Propionibacterium*

acnes, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Fusobacterium nucleatum* foram isolados das amostras 16.2%, 9.5%, 6.8% e 5.4% respectivamente. Quinze amostras abrigaram mais de uma espécie. A associação predominante foi *P. acnes*, *S. epidermidis* e *F. nucleatum*. A microbiota de lesões perirradiculares persistentes é composta por diversos tipos de microrganismos com capacidade de formação de biofilme, incluindo *P. acnes*, *S. epidermidis* e *F. nucleatum*.

Ozbek e Ozbek (2010) investigaram a presença de "complexo vermelho" em abscesso perirradicular agudo por qPCR. Amostras microbiológicas foram coletadas por aspiração em 32 casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo. O DNA foi extraído a partir das amostras usando um mini-kit DNA QIAamp e analisados por qPCR. Pelo menos um membro do complexo vermelho foi encontrado em 84% dos casos. Em geral *T. denticola*, *P. gingivalis*, e *T. forsythia* foram detectados em 65,6%, 43,7%, e 40,6% dos casos, respectivamente. Bactérias do "complexo vermelho" foram detectadas em 15,6% das amostras coletadas no abscesso perirradicular agudo. Os autores sugeriram que "complexo vermelho" pode participar na patogênese do abscesso perirradicular agudo.

Zoletti et al. (2010), compararam as estruturas da comunidade bacteriana encontradas em dentes com tratamento endodôntico, onde apresentavam lesão periapical (n=12) e sem lesões perirradiculares (n=11), por meio de técnicas moleculares. Os resultados confirmaram uma composição polimicrobiana mesmo em pacientes tratados sem doença pós-tratamento. A grande diversidade da comunidade microbiana foi observada para os dentes tratados, tanto com ou sem doença, mas nenhum padrão específico foi detectado para os dentes doentes. No entanto, o número de bandas de amostras em dentes com periodontite apical com presença de lesão foi estatisticamente significativamente maior (P= 0.04) do que a partir de amostras coletadas de dentes com canal radicular tratado sem periodontite apical pós-tratamento. Além disso, as bandas predominantes em amostras de pacientes com doença apical foram também observadas.

Rôças et al. (2011), analisaram a microbiota de infecções primária do canal radicular de pacientes adultos noruegueses. As amostras foram coletadas dos canais radiculares de dentes com necrose e periodontite apical sintomático (n = 13) ou assintomático (n = 21) e abscessos apicais crônicos (n = 9). O DNA foi extraído a partir de amostras, e identificações bacterianas foram realizados por abordagem checkerboard captura reversa de 50 patógenos endodônticos. O DNA bacteriano foi

detectado em todos os casos. Em dentes com periodontite apical assintomática, a taxa mais frequente foram *Dialister invisus* (71%), *Fusobacterium nucleatum* (62%), e *Porphyromonas endodontalis* (62%). Em abscessos apical crônico, a taxa mais prevalente foram *P. endodontalis* (100%), *D. invisus* (89%), *Parvimonas micra* (78%), e *Solobacterium moorei* (78%). Em dentes com periodontite apical sintomática, as taxas mais prevalentes foram: *D. invisus*, *P. endodontalis*, *S. moorei*, *Propionibacterium acnes*, e as espécies de *Streptococcus* (todos em 69%). Nenhum dos táxons orientado foi significativamente associado com uma fístula ou dor ($P > 0,05$), exceto para *Selenomonas sputigena*, que foi mais frequentemente encontrado em casos dolorosos ($P = 0.04$). Nenhuma taxa foi encontrada em níveis mais altos de significância em todas as condições ($P > 0,05$). A análise de Cluster revelou agrupamentos bacterianos que diferiram entre os casos de dentes com ou sem sintomatologia. Apesar de, basicamente, as mesmas espécies serem altamente prevalente nas diferentes condições examinadas e nenhum dos mais prevalentes táxons foram associados positivamente com os sintomas, resultados revelaram as espécies formadas em parcerias diferentes e associações em amostras de dentes com sintomatologia ou não. Portanto, é possível que comunidades multi espécies possam formar como resultado de combinações globais de bactérias e que dão origem a inflamação aguda.

2.2 Estudos *in vivo* avaliando o grau de redução microbiana após preparo químico-cirúrgico e/ou após uso da medicação intra-canal.

Tang et al. (2004) avaliaram a eficácia do hidróxido de cálcio e sulfato de frameticina (Septomixine) em eliminar bactérias dos sistemas de canais radiculares durante a terapia endodôntica usando métodos moleculares. Foram analisados um total de 31 dentes unirradiculares com infecção primária, após o acesso, instrumentação e irrigação com solução salina e medicação intracanal por uma semana com hidróxido de cálcio ($n=25$) ou Septomixine ($n=6$). O DNA genômico foi isolado das amostras de canais e iniciadores universais foram desenvolvidos para detectar o total de bactérias no interior do canal radicular. Uma região do 16S rDNA foi amplificada e marcado para detectar espécies de *Actinomyces* por hibridização

num total de 7 sondas de oligonucleotídeos específicos para *A. bovis*, *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. Meyeri*. O resultado mostrou que 25 de 31 canais examinados foram positivos, para detectar microrganismos residuais. Após instrumentação, irrigação com solução salina e uma semana de medicação, somente seis canais estavam livres de bactérias depois do tratamento. Os autores concluíram que a medicação com hidróxido de cálcio ou Septomixine em terapia endodôntica não inibiu efetivamente o crescimento bacteriano durante o intervalo entre as consultas. Investigações futuras usando reação em cadeia da polimerase são necessárias para comprovar os achados.

Horz et al. (2005) reexaminaram 10 iniciadores universais que já tinham sido previamente publicados em estudos de PCR e usaram o software ARB com um banco de dados com 41.000 seqüências do gene 16S rRNA. Os autores descobriram que eles diferiam consideravelmente em sua cobertura no domínio bactéria. Analisaram 32 dentes unirradiculares que apresentavam necrose pulpar assintomático com evidência de perda óssea periapical. Os dentes foram aleatoriamente divididos em dois grupos: G1: NaOCl 2.5% e G2: gel de clorexidina 2%. Para determinarem a redução bacteriana foi realizado qPCR e testados com o kit SYBRGreen e TaqMan, e métodos de cultura. Embora a redução microbiana no grupo de tratamento do NaOCl foi na maioria dos casos superior a 99% (para o SYBRGreen, com média de 99,64% e mediana de 99,99%, para o TaqMan com média de 94,23% e mediana de 99,63%), foi observada uma redução microbiana muito mais baixa no grupo do gel CHX (SYBRGreen, com média de 82,91% e mediana de 96,62%, TaqMan, com média de 86,62% e mediana de 96,60%). Esta diferença entre os dois grupos de tratamento foi estatisticamente significativa. Também foi determinado a carga bacteriana por contagem de colônia. Nas amostras iniciais, os números de UFC variou de 4×10^2 a 1×10^6 , com uma mediana de $3,2 \times 10^5$ UFC. Em contraste, a UFC nas amostras pós-tratamento diminuiu drasticamente a um mediana de 0 a $6,8 \times 10^2$ UFC. A contagem foi semelhante em ambos os grupos de tratamento (para o CHX grupo gel, média de 99,6% e mediana de 99,9%; para o grupo NaOCl, significam de 99,9% e mediana de 100%). A avaliação da carga total de bactérias em uma amostra por PCR, certamente, terá um aumento no impacto sobre o futuro da microbiologia, sua aplicação prevista pelo teste das sondas e iniciadores em cobrir as espécies mais importantes ou dominantes em uma determinada amostra.

Vianna et al. (2006) avaliaram em um estudo *in vivo* o grau de redução microbiana após o preparo químico cirúrgico em canais de dentes humanos que estavam com polpa necrótica usando dois agentes irrigantes endodônticos hipoclorito de sódio (NaOCl) ou gel de clorexidina (CHX). Trinta e dois dentes unirradiculares com polpa necrosada foram divididos em dois grupos. Um grupo foi irrigado com hipoclorito de sódio 2.5% NaOCl (n=16), e no outro foi irrigado com gel de clorexidina 2% CHX (n=16). A carga bacteriana foi avaliada usando qPCR e os marcadores moleculares com SYBRGreen e TaqMan. Para contraste, a carga bacteriana foi também determinada pela tradicional técnica de cultura. A carga bacteriana foi reduzida substancialmente em ambos os grupos (96%). No entanto, usando qPCR a carga bacteriana antes e após o preparo foi maior quando comparado com avaliação da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Além disso, medido por qPCR, a redução bacteriana no grupo do NaOCl (SYBRGreen: 99.99%; TaqMan: 99.63%) foi significativamente maior ($P < 0.01$) que o grupo da CHX (SYBRGreen: 96.62%; TaqMan: 96.60%). De acordo com a técnica da cultura 75% dos casos estavam livre de bactérias após os preparos químico cirúrgico no grupo do NaOCl, ao passo que no grupo do gel de clorexidina 50% dos casos estavam livre de bactérias. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio não só possuíam uma maior capacidade de matarem os microrganismos, como também eram mais capazes de remover células de dentro do canal.

Williams et al. (2006) compararam os métodos de cultura bacteriana convencional e qPCR para detecção e quantificação de *E. faecalis* durante o tratamento endodôntico. O método de PCR transcriptase reversa (RT-PCR) foi também desenvolvido para detectar a bactéria viável, mas no estado não cultivável (BVNC). Amostras do canal radicular (n= 87) foram coletadas em pós preparo e pós-medicação com hidróxido de cálcio n=15 (primário) e n=14 (infecção refratária) em 29 dentes unirradiculares, e analisados pelos três métodos. As bactérias foram até três vezes mais prevalentes em infecções refratárias do que em infecções primárias em cada etapa de coleta. Em geral, qPCR detectou significativamente mais *E. faecalis* do que cultura ($p < 0,001$). *E. faecalis* BVNC foi detectado por RT-PCR em quatro amostras que foram negativos pela cultura. Estes resultados suportam qPCR e RT-PCR como métodos mais sensíveis do que o cultura para a detecção de *E. faecalis* em infecções endodônticas.

Sakamoto et al. (2007) avaliaram a diminuição da taxa bacteriana após procedimentos de antissepsia intracanal e determinou a taxa de persistência bacteriana após o tratamento. Amostras dos canais com periodontite apical (S1) foram coletadas usando hipoclorito de sódio como irrigante (S2) e após medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio (S3) foram submetidas a análise de qPCR e análise da biblioteca do gene clone 16S rRNA. No S2 e S3 amostras de 5 dos 15 canais mostraram resultados negativos. Em outros casos a instrumentação e instrumentação/medicação promoveram uma redução significativa (99.67% e 99.85%, respectivamente) no número de bactérias comparadas com amostras do grupo S1. Quarenta e três taxa bacterianas distintas foram identificadas, em 24 (56%) eram filotipos não cultiváveis. Dezenove dessas 43 (incluindo 8 como filotipo não cultivável) foram divulgados em amostras após o tratamento, com espécies de *streptococci* sendo a taxa mais prevalente. Os achados demonstraram que o método independente de cultura forneceu uma visão detalhada sobre efeitos de protocolos de antissepsia intracanal, ajudando a definir estratégias mais eficazes para lidar com bactérias endodônticas, incluindo, ainda filotipos não cultiváveis.

Siqueira et al. (2007a) investigaram a redução bacteriana após a instrumentação usando hipoclorito de sódio 2.5% NaOCl como substância irrigante e medicação intracanal entre sessões com pasta de hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ com paramonoclorofenol canforado (PMCC). Onze dentes com infecção periapical primária e periodontite apical crônica foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Amostras bacterianas foram coletadas antes (S1) e após o tratamento (S2) usando limas manuais de níquel-titânio e hipoclorito de sódio 2.5% (NaOCl) seguido de medicação por 7 dias com pasta de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado PMCC (S3). As bactérias provenientes do canal radicular foram cultivadas em três estágios contadas e identificadas por análise do sequenciamento do gene 16S rRNA. No grupo S1 em todos os casos a taxa de bactérias por canal abrigou um número de 2.8 (média: 1–6). No grupo S2 foi de 6 de 11 (54.5%) dos casos resultantes de cultura positiva, com 1 a 3 três espécies por canal. No grupo S3, somente 1 caso (9.1%) foi positivo para a presença de bactérias, como *Propionibacterium acnes*. Uma redução bacteriana significativa foi observada entre os grupos S1 e S2, e S1 com S3. Diferenças significantes também foram observadas entre as amostras do grupo S2 e S3 ambos com redução quantitativa (p=0.029) e números de casos de cultura negativa (p=0.03). Os autores

concluíram que o preparo químico mecânico com o irrigante hipoclorito 2.5% (NaOCL) e medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio/PMCC reduziu significativamente o número de bactérias no canal mas não tornou o canal totalmente livre de bactérias em mais da metade dos casos. Com o uso de medicação intracanal por 7 dias com pasta de Ca(OH)₂/CPMC, aumentou significativamente casos de cultura negativa.

Vianna et al. (2008) detectaram em um estudo as espécies bacterianas e a quantidade do número de bactérias em amostras de canal infectados em canais radiculares antes (S1) e após preparo químico cirúrgico (S2) usando gel de clorexidina 2% (CHX) como substância química auxiliar e após a medicação intracanal por sete dias (S3). Para comparar a mudança no ambiente microbiano. Vinte e quatro dentes foram selecionados para esse estudo. Preparo químico mecânico foram realizados utilizando gel de clorexidina 2% (CHX) e três medicações intracanaís diferentes M1- pasta de hidróxido de cálcio Ca(OH)₂; M2- gel de clorexidina 2% CHX e M3- pasta de hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ e gel de clorexidina 2% CHX, usados por 7 dias. Foi utilizada hibridização Checkerboard DNA–DNA para detectar 40 espécies de comunidades bacterianas. Técnicas de cultura anaeróbicas e aeróbicas foram usadas para determinar a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). As espécies mais frequentemente identificadas em S1 foram: *Fusobacterium nucleatum*, ssp. *polymorphum*, *Treponema socranskii* ssp. *socranskii*, *Parvimonas micra* e *Enterococcus faecalis*. Em S2 e S3 um total de 8 diferentes espécies foram identificadas e somente um deles era gram positivo (*E. faecalis*). Não foram encontrados microrganismos após o uso de M2 por 7 dias. A quantidade obtida em placas Agar variou entre 4×10^5 a 2.6×10^6 UFC/ mL em S1, ou seja, a UFC foi reduzida em 99.96% em S2, e não havia diferença significativa entre a UFC em S2 e S3. Os autores concluíram que o efeito antimicrobiano do preparo mecânico complementado com medicação antibacteriana reduziu muito a presença destes microrganismos no interior dos canais radiculares.

Blome et al. (2008) avaliaram a presença e o número de espécies específicas, bem como a carga bacteriana total em dentes com periodontite apical crônica usando qPCR, em quarenta pacientes adultos que apresentavam infecções primárias e secundárias, exigindo retratamento, três amostras foram colhidas, após a remoção do tecido pulpar necrótico, após o preparo do canal e após 14 dias de medicação intracanal com hidróxido de cálcio. Análise por qPCR permitiu a

quantificação da contagem total de bactérias de nove espécies selecionadas. Os canais radiculares com infecções primárias abrigaram as bactérias significativamente mais do que os dentes com infecções secundárias ($P < 0,05$) por contagem total de bactérias. Após preparo e curativo de demora foi significativamente reduzida. Os autores concluíram que em canais com infecções primárias continham uma maior carga bacteriana e pós preparo químico-mecânico do canal radicular a contagem bacteriana diminuiu, pelo menos em 95%.

Rôças e Siqueira (2010) identificaram a taxa de bactérias persistentes em dentes com periodontite primária e secundária usando RNA ribossomal 16S da reação em cadeia da polimerase combinada com transcrição reversa (RT-PCR) e hibridização checkerboard combinado com captura reversa. Amostras foram coletadas de 15 dentes com periodontite apical antes do tratamento (S1), após o preparo biomecânico usando hipoclorito de sódio como irrigante (S2), e após a medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio (S3). A presença de bactéria foi rastreada primeira por ensaio de PCR baseado no DNA. Extratos de RNA foram submetidos a RT-PCR, e os produtos resultantes foram pesquisados para a presença de 28 táxons utilizando o método de checkerboard. As bactérias foram encontradas em todas as amostras (S1). Níveis detectáveis de bactéria (RNA ribossomal), utilizada como um indicador da viabilidade foi observado em 60% dos casos após preparo químico cirúrgico e 53% após medicação intracanal. As taxas mais prevalentes em S1 foram *Olsenella uli* (67%), *Pyramidobacter piscolens* (60%), *Streptococcus* espécies (53%), e Bacteroidetes clone X083 (53%). Espécies de *Streptococcus* (47%), *Fusobacterium nucleatum* (40%), e *O. uli* (33%) prevaleceram em S2, considerando que as espécies de *Streptococcus* (47%), *Propionibacterium acnes* (27%), e *O. uli* (27%) foram os táxons mais frequentes no S3. O presente estudo revelou com uma abordagem molecular combinado, que a diversidade bacteriana foi em geral marcadamente reduzida por procedimentos de tratamento. Embora maioria da taxa bacteriana frequentemente identificada, em amostras de pós-tratamento, emergem como risco potencial para doenças persistentes, que continua a ser determinado por estudos longitudinais.

Rôças e Siqueira (2011a) compararam o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio 2.5% (NaOCl) e o dicluonato de clorexidina 0.12% (CHX) quando usado como irrigante durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Quarenta e sete canais únicos com necrose pulpar e periodontite apical assintomático foram

selecionados para este estudo e de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Amostras bacterianas foram coletadas antes (S1) e após o preparo químico mecânico (S2) usando hipoclorito de sódio 2.5% NaOCl (n = 30) ou CHX 0.12% (n = 17) como irrigante. Presença de bactérias, archae e fungos foram amplamente avaliados por reação em cadeia da polimerase (PCR), enquanto que a identificação bacteriana foi realizada por checkerboard captura reversa para 28 patógenos endodônticos. Todas as amostras do S1 foram positivas para a presença bacteriana e negativa para a presença da archae e fungos. Ambas as substâncias testadas foram significativamente eficazes na redução dos níveis de bactérias. Nenhuma diferença significativa foi observada entre eles em todos os testes paramétricos incluindo a incidência de resultados negativos de PCR no grupo S2 (40% para NaOCl versus 47% para CHX, $p = 0.8$), redução na taxa por canal ($p = 0.3$) e redução nos níveis bacterianos ($p = 0.07$). *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus species*, *Porphyromonas endodontalis* e *Selenomonas sputigena* foram mais prevalentes nas amostras do grupo do hipoclorito em S2. *Dialister invisus*, *Actinomyces israelii*, *Prevotella baroniae*, *Propionibacterium acidifaciens* e espécies de *Streptococcus* foram os mais prevalentes no grupo da CHX em S2. Os autores concluíram que ambas as substâncias reduzem significante os níveis de bactérias não havendo diferença significativa entre as substâncias.

Rôças e Siqueira (2011b) avaliaram os efeitos antimicrobianos do preparo químico mecânico suplementado pela medicação intracanal durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Amostras de vinte e quatro dentes que apresentaram necrose foram coletadas antes (S1), e após o preparo químico mecânico usando como irrigante hipoclorito de sódio 2.5% NaOCl (S2) e após 7 dias da medicação de demora com pasta de hidróxido de cálcio com glicerina (CHG) ou glicerina com paramonoclorofenol canforado (CHPG) (S3). Bactérias, archae, e fungos foram avaliados por reação em cadeia da polimerase e espécie bacteriana por checkerboard captura reversa identificando 28 patógenos endodônticos. Todas as amostras do S1 foram positivas para bactéria, mas negativo para archaea e fungos. Os procedimentos de tratamento foram altamente efetivos na redução dos níveis de bactérias. Cerca de 46% das amostras do S2 e 62.5% das amostras do S3 foram negativos no exame do PCR para bactérias. Especificamente em amostras do S2 e S3 resultou PCR negativo em 50% e 58% dos canais no grupo do CHG e em 42% e 67% dos canais no grupo do CHPG respectivamente. Exceto em comparações com

amostras S1, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos e intra-grupo envolvendo S2 e S3. *Propionibacterium acnes* e espécies de *Streptococcus* foram observadas mais prevalentes em S2 e S3. Níveis de redução bacteriana foram substancialmente diminuídas após o preparo químico mecânico e medicação intracanal, entretanto a presença detectável de bactérias persistentes sugere que estratégias de tratamento com efeitos antimicrobianos mais eficazes sejam estimuladas.

Ito et al. (2011) em um estudo *in vivo* avaliaram a microbiota de canais radiculares de 30 dentes com periodontite apical primária e os efeitos antimicrobianos da medicação intracanal pasta de hidróxido de cálcio/ clorexidina em canais com periodontite apical primária. Os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio contendo clorexidina 1% por 14 dias e uma segunda coleta foi realizada. As amostras foram submetidas aos procedimentos de cultura microbiológica para detectar a presença de bactérias e processados para técnica de hibridização checkerboard DNA- DNA. Cultura microbiana revelou alta prevalência e contagem de UFCs de microrganismos anaeróbicos, *bacteróides* pigmentados de preto, *Streptococcus*, e aeróbicos. Com a medicação o número de UFCs diminuiu drasticamente comparado com a contaminação inicial ($P < 0.05$), embora a prevalência não mudasse ($P > 0.05$). Das 35 sondas usadas na hibridização checkerboard DNA-DNA, 31 (88.57%) estavam presentes na linha de base. E seguido a medicação o número de sondas reduziu para 13 (37.14%). Igualmente o número de células bacterianas diminuiu após a aplicação da medicação ($P = 0.006$). Os autores concluíram que a periodontite apical é causada por infecção polimicrobiana e a medicação pasta de hidróxido de cálcio e clorexidina foi efetivo em reduzir a população de bactérias no canal radicular.

Endo et al. (2012) quantificaram bactérias cultiváveis e endotoxinas em canais radiculares com pós- tratamento de periodontite apical, correlacionando com as características clínicas e para avaliar o efeito do preparo químico cirúrgico, com gel clorexidina 2% e EDTA 17% para remoção e eliminação de endotoxinas bacterianas. Além disso, bactérias Gram-negativa anaeróbica estrito foram investigados por reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras de quinze dentes com pós-tratamento de periodontite apical foram coletadas antes (S1) e após (S2). Técnicas de cultura determinou o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Ensaio por PCR e Limulus Amebocyte Lisado (LAL) foram utilizados para a detecção de

endotoxina bacteriana. *Prevotella nigrescens* (4/15), *Prevotella intermedia* (2/15), e *Tannerella forsythia* (2/15) foram os mais frequentemente espécies detectadas. Endotoxina foi recuperada em 100% das amostras. No S1, bactérias e endotoxinas foram detectados a um valor mediano de 5.14×10^3 UFC / mL e 3.96 UE / mL, respectivamente. Níveis mais elevados de endotoxinas foram relacionados para um tamanho maior de área radiolúcida (> 5 mm) ($p < 0,05$). O PQC foi mais eficaz na redução de bactérias (99,61%) do que a endotoxina (60,6%) (ambos $p < 0,05$). Os resultados obtidos indicam que os níveis de endotoxina encontrados em canais radiculares infectados foram relacionados para um tamanho maior de área radiolúcida na região periapical. Além disso, o PQC foi eficaz na redução de bactérias e no conteúdo de endotoxina em pós-tratamento de periodontite apical.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como proposta uma análise crítica da literatura sobre as metodologias empregadas em trabalhos *in vivo* avaliando: composição da microbiota e antissepsia em canais radiculares, empregando métodos moleculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Como metodologia, o presente estudo apresentou uma análise dos resultados obtidos por revisão literária, baseada em estudos *in vivo* por métodos moleculares que avaliavam a capacidade de antissepsia e identificação da microbiota nos sistemas de canais radiculares, incluindo a busca dos últimos 10 anos.

5 RESULTADOS

Para uma melhor análise e compreensão do assunto abordado os trabalhos foram agrupados e seus dados inseridos nas tabelas, 5.1 a 5.3.

Tabela 5.1- Estudos de identificação da microbiota nos sistemas de canais radiculares infectados
n- número de amostras; PCR – reação em cadeia da polimerase; qPCR- reação em cadeia da polimerase em tempo real; spp- espécie; MO – microrganismo; nPCR- nested PCR; PCR-RT- reação em cadeia da polimerase combinada com transcrição reversa

Autor	Objetivo	n	Microrganismo avaliado	Metodologia	Comentários
Rolph et al. (2001)	Avaliaram a diversidade de bactérias presentes em canais radiculares infectados.	n=41	<i>Enterococcus Lactobacillus, Propionibacterium, Streptococcus</i> e dois clones. <i>Fistula- Lactobacillus, Pantoea, Prevotella, e Selenomonas</i>	PCR/clonagem e sequenciamento/ cultura	Destaque para o uso de métodos moleculares apresentarem melhores resultados que estudos em cultura
Nadkarni et al. (2002)	Avaliação de um conjunto de primers universais e sondas para a amplificação do 16S rDNA de domínio bactéria para estimar carga bacteriana total.	n= 34 spp bacterianas	34 espécies bacterianas	qPCR/ cultura	Destaque para utilidade do qPCR, na análise de carga bacteriana.
Fouad et al. (2002)	Avaliaram 10 supostos patógenos bacterianos em canais radiculares com polpa necrótica	n=24	<i>Streptococcus</i> spp; <i>Fusobacterium nucleatum</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> -sintomatologia; <i>P. gingivalis</i> e <i>Porphyromonas endodontalis</i> - <i>Diabetes mellitus. Olsenella</i>	PCR/ Clonagem e sequenciamento	O uso de clonagem e sequenciamento revelou bactérias não descritas.
Siqueira et al. (2003)	Investigaram <i>P. micros</i> em canais radiculares com infecção primária	n= 50	<i>Peptostreptococcus micros</i> - 28%, lesão periapical crônica assintomático 27.3%; periodontite apical aguda-25%; abscesso perirradicular agudo-30%	PCR	Alguns MO são de difícil cultura, exceto <i>P. micros</i> , pois é de fácil cultivo, destacando a utilidade do PCR.

(Continua)

Autor	Objetivo	n	Microrganismo avaliado	Metodologia	Comentários
Siqueira e Rôças (2003a)	Investigaram a ocorrência de 2 tipos de <i>Campylobacter</i> em canal radicular com infecção primária	n= 57	<i>Campylobacter gracilis</i> -21.4% e <i>Campylobacter rectus</i> -30%	PCR/ nPCR	O uso de nPCR é mais sensível que PCR para identificação de MO específico.
Siqueira e Rôças (2003b)	Investigaram a ocorrência de quatro <i>treponemas</i> em casos de infecção endodôntica primária	n= 31	<i>T. maltophilum</i> -39% (33% assintomáticos, 50% sintomáticos) <i>T. lecithinolyticum</i> - 26% (33% assintomáticos, 10% sintomáticos) <i>T. amylovorum</i> - 7% (5% assintomáticos, 10% sintomáticos) <i>T. médium</i> - 13% (14% assintomáticos, 10% sintomáticos)	nPCR	O uso de nPCR é mais sensível que PCR para identificação de MO específico
Rôças et al. (2004)	Avaliaram 9 patógenos em doenças persistentes em uma população sul-coreana	n=14	<i>Enterococcus faecalis</i> (64%), <i>Streptococcus</i> spp. (21%) e <i>Tannerella forsythensis</i> (14%).	PCR	Utilizaram diversos primers específicos para detecção de bactérias.
Siqueira e Rôças (2004a)	Avaliar várias espécies microbianas em casos de falha no tratamento endodôntico	n=22	<i>Enterococcus faecalis</i> (77%), <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> (52%), <i>Propionibacterium propionicum</i> (52%), <i>Dialister pneumosintes</i> (48%), <i>Filifactor alocis</i> (48%), <i>Cândida albicans</i> (9%)	PCR	Utilizaram diversos primers específicos para detecção de bactérias.
Siqueira e Rôças (2004b)	Investigaram <i>Centipeda periodontii</i> em infecções endodônticas primárias	n=50	13%- assintomáticos; 14%-periodontite apical aguda; 15%- abscessos perirradiculares agudas	PCR/ nPCR	O uso de nPCR é mais sensível que PCR para identificação de MO específico
Kaufmam et al. (2005)	Prevalência do <i>Enterococcus</i> em dentes tratados com lesão periapical em comparação com dentes que necessitam de retratamento sem lesão.	n=58	Bactérias foi de 90% e <i>Enterococcus</i> spp. foi de 12%.	PCR	Destaque para o uso de iniciadores específicos mais sensíveis e otimização nas reações. (Continuação)

Autor	Objetivo	N	Microrganismo avaliado	Metodologia	Comentários
Sedgley et al. (2006a)	Investigaram a prevalência de <i>E. faecalis</i> em várias amostras orais.	n=41	68% em vários locais e 5% em canais	Cultura/PCR/sequenciamento	PCR foi mais sensível que cultura.
Sedgley et al. (2006b)	Compararam duas técnicas de detecção e quantificação do <i>E. faecalis</i>	n=21	<i>E. faecalis</i> - 10,2%- cultura e 79,5%- PCR-TR e 89,6%- infecção secundária e 67,5%- em primária	qPCR/ cultura	PCR foi mais sensível em detectar <i>E. faecalis</i> do que cultura.
Siqueira e Rôças (2006)	Examinaram amostras de infecções endodônticas primárias para a presença de <i>Catonella morbi</i>	n=50	<i>C. morbi</i> 33% e <i>G. adiacens</i> 19%; periodontite apical crônica- 30% e 10%; periodontite apical aguda- 16% e 11%, abscessos agudo 26% e 14%.	Semi nPCR/sequenciamento	O uso de nPCR é mais sensível que PCR para identificação de MO específico
Gomes et al. (2006a)	Investigaram a presença de <i>E. faecalis</i> em infecções endodônticas primária e secundária.	n=50	4%- primária; 42%- secundária por cultura e 82%- primária; 76%- secundária por PCR	Cultura/PCR	PCR identificou mais que em cultura
Gomes et al. (2006b)	Investigar a presença de anaeróbios estritos: <i>Filifactor alocis</i> , <i>Forsythia Tannerella</i> , e <i>Treponema denticola</i> em infecção 1ária e 2ária	n=100	<i>F. alocis</i> - 23- primária; 12- secundária; <i>T. forsythia</i> - 12- primária; 3- secundária; <i>T. denticola</i> - 19- primária; 12- secundária.	nPCR/sequenciamento	Cuidados devem ser tomados com a contaminação com nPCR, método bastante sensível
Siqueira e Roças (2007)	Investigaram a presença e identidade de <i>Synergistes</i> em infecções primárias	n=50	1/3- <i>Synergistes</i> ; clones orais W028 e W090 BA121/P4G_18 P1, e BH017 e E3_33.	Semi nPCR/sequenciamento	Utilização de primers para verificar presença bacteriana e ausência de inibidores da reação de PCR.
Vianna et al. (2007)	Caracterizaram e quantificaram os filotipos predominantes <i>Synergistes</i> em canais radiculares	n=32	<i>Synergistes</i> total variou de $4,5 \cdot 10^4$ para $1,5 \cdot 10^6$. 0,79% da comunidade bacteriana total.	qPCR/sequenciamento	qPCR utilizado na quantificação e sequenciamento para identificação. (Continuação)

Autor	Objetivo	N	Microrganismo avaliado	Metodologia	Comentários
Siqueira et al. (2007b)	Identificaram bactérias com periodontite apical crônica	n=29	Taxa por canal- 3,1; bactérias cultiváveis- 4,2 x 10 ⁵ ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>alactolyticus Pseudoramibacter</i> , <i>Micromonas micros</i> e <i>estreptococos</i> mais prevalentes.	Cultura/PCR/sequenciamento	A combinação de vários métodos possibilitou identificar diversos MO inclusive os não cultiváveis e não indentificados.
Gomes et al. (2007)	Investigaram a correlação endodôntica entre sinais e sintomas clínicos e a presença do complexo vermelho.	n=50	<i>P gingivalis</i> , <i>T denticola</i> , e <i>T forsythia</i> 46%, 38%, e 22% dos casos sintomáticos, respectivamente. dor espontânea 14%, dor à percussão, inchaço e dor à palpação.	nPCR	Devido a grande sensibilidade vários controles negativos devem ser realizados
Cogulu et al. (2007)	Investigaram a presença de <i>Enterococcus faecalis</i> em infecções endodônticas em dentes decíduos.	n=145	<i>E. faecalis</i> : 18%- decíduos; 26%- permanentes. Por PCR: 22%- decíduo; 32%- permanentes.	Cultura/ PCR	Métodos de cultura e PCR são sensíveis para detectar <i>E. faecalis</i> em canais radiculares.
Gomes et al. (2008)	Investigaram a presença de nove espécies bacterianas em infecções secundárias com lesão periapical.	n=45	<i>Enterococcus faecalis</i> - 77,8%; <i>Peptostreptococcus micros</i> - 51,1%. <i>Porphyromonas gingivalis</i> - 35,6%, <i>Porphyromonas endodontalis</i> - 22,2%, <i>Prevotella Nigrescens</i> - 11,1%, <i>Prevotella intermedia</i> - 11,1%, <i>Filifactor alocis</i> - 26,7%, <i>Treponema denticola</i> - 24,4%, <i>Tannerella forsythia</i> - 4,4%.	PCR	<i>E faecalis</i> foi o mais identificado por PCR
Sakamoto et al. (2008)	Determinaram a microbiota do canal radicular tratados com pós-tratamento de periodontite apical	n=9	74 taxa bacteriana pertencente 6 filós. 55% não cultivável. 25- novos. Média de 10 taxa por caso.	Análise clone biblioteca / semi nPCR	Este estudo permitiu identificar 10 novos patógenos. (Continuação)

Autor	Objetivo	n	Microrganismo avaliado	Metodologia	Comentários
Cogulu et al. (2008)	Avaliaram a presença de 14 agentes patogênicos em dentes permanentes e decíduos.	n=145	<i>T. denticola</i> - radiolucidez periapical e dor anterior, <i>P. Gingivalis</i> - sensibilidade à percussão- decídua e nos permanentes.	PCR	Utilizou primer universal para verificar presença bacteriana
Schirrmeister et al. (2009)	Isolaram e detectaram microrganismos de canais com infecção secundária e lesão periapical.	n=18	Cultura mista de 2-8 espécies. <i>Vagococcus fluvialis</i> detectado pela primeira vez. <i>Solobacterium moorei</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> - mais prevalentes.	Análise morfológica/ bioquímicos/ PCR/ seqüenciamento	Foram utilizados vários métodos para identificação bacteriana.
Siqueira et al. (2009)	Investigaram a ocorrência e os níveis de taxa de bactérias diversas no canal radicular apical dentes com periodontite apical		Taxa detectada: <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> (32%), <i>Bacteroidetes</i> clone X083 (26%), espécies de <i>Streptococcus</i> (21%), <i>Olsenella uli</i> (10,5%), <i>Synergistes</i> clone BA121 (10,5%), <i>Fusobacterium nucleatum</i> (10,5%), <i>Porphyromonas endodontalis</i> (10,5%), <i>Dialister</i> clone BS016 (5%), <i>Filifactor alocis</i> (5%), <i>Parvimonas micra</i> (5%), e <i>Treponema denticola</i> (5%).	Hibridização checkerboard captura reversa/ PCR	Uma das vantagens deste método é que permite a detecção simultânea de várias espécies bacterianas e ainda não cultivadas em várias amostras e de elevada especificidade
Subramanian e Mickel 2009	Determinaram a frequência de colonização das bactérias em lesões caracterização em ápices radiculares e lesões perirradiculares.	n=34	<i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Burkholderia</i> ambas as amostras. <i>Campylobacter gracilis</i> e <i>Streptococcus gordonii</i> - região apical. <i>Atopobium Rimae</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Streptococcus</i> genomo species C8, <i>Dialister</i> sp E2_20 E1, e <i>Eubacterium</i> A35MT- lesões perirradiculares	qPCR/clonagem/ sequenciamento	O uso das técnicas moleculares revelou um inesperado perfil bacteriano.
Ozbek et al. (2009)	Investigaram a presença de <i>Enterococcus faecalis</i> em infecções endodônticas primárias e em retratamentos em uma população turca	n=79	<i>E. faecalis</i> - 61%; <i>E. faecalis</i> em infecções primárias- 74,4%; em retratamentos- 25%	qPCR	Várias vantagens no uso do qPCR, uso do SYBERGreen (Continuação)

Autor	Objetivo	N	Microrganismo avaliado	Metodologia	Comentários
Saito et al. (2009)	Avaliaram <i>Porphyromonas gingivalis</i> e <i>Tannerella forsythia</i> em infecções endodônticas primárias.	n=32	<i>P. gingivalis</i> - 28%, <i>T. Forsythia</i> - 66% em ambas- 22%. <i>P. gingivalis</i> e <i>T. forsythia</i> variou de 5.65×10^6 a 1.20×10^2 e <i>T. forsythia</i> 5.76×10^6 a 1.35×10^1 .	qPCR	qPCR pode fornecer até 41 vezes maior sensibilidade quando comparados cultura.
Fuji et al. (2009)	Investigaram composição da microflora de lesões periapicais secundárias.	n=20	Anaeróbios facultativos (51,6%). <i>Propionibacterium acnes</i> - 16.2%; <i>Staphylococcus</i> 9.5%, <i>epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6.8% e <i>Fusobacterium nucleatum</i> - 5.4%	Sequenciamento/ cultura anaeróbia e aeróbia	Utilizou primer disposto no kit.
Ozbek e Ozbek (2010)	Investigaram a presença de "complexo vermelho" em abscesso perirradicular agudo.	n=32	<i>T. denticola</i> - (65,6%); <i>P. Gingivalis</i> (43,7%); <i>T. forsythia</i> 40,6%. Complexo vermelho-15.6%	qPCR	qPCR é um método com vantagens da rapidez, capacidade de identificar e quantificar os produtos de PCR sem contaminação.
Zoletti et al. (2010)	Compararam as comunidades em dentes com canal radicular com tratamento.	n=23	Composição polimicrobiana em pacientes tratados sem doença pós-tratamento, diversidade microbiana em dentes tratados, o número de bandas de amostras de periodontite apical com lesão foi significativamente maior (P= 0.04)	PCR-DGGE	Permite a visualização da estrutura da comunidade bacteriana, incluindo taxa de difícil cultura ou ainda não cultivados.
Rôças et al. (2011)	Analisaram a microbiota de infecções primária do canal radicular de pacientes adultos noruegueses.	n =43	Periodontite apical assintomática- <i>Dialister invisus</i> (71%), <i>Fusobacterium nucleatum</i> (62%), e <i>Porphyromonas endodontalis</i> (62%); abscessos apical crônico- <i>P. endodontalis</i> (100%), <i>D. invisus</i> (89%), <i>Parvimonas micra</i> (78%), e <i>Solobacterium moorei</i> (78%); periodontite apical sintomática: <i>D. invisus</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>S. moorei</i> .	Checkerboard captura reversa	Análise semi quantitativa da presença de várias bactérias cultiváveis e ainda não cultivável simultaneamente. (Conclusão)

Tabela 5.2 - Estudos analisando a capacidade de redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico. SQA- substância química auxiliar; n- número de amostras; MIC- medicação intracanal; PQC- preparo químico-cirúrgico; Ca(OH)₂ – hidróxido de cálcio; NaOCl- hipoclorito de sódio; CHX- clorexidina;PMCC- paramonoclorofenol canforado; PCR- reação em cadeia da polimerase; qPCR– reação em cadeia da polimerase em tempo real; RT-PCR- reação em cadeia da polimerase combinada com transcriptase reversa; MO- microrganismos

Estudo	Objetivo	N	SQA	MIC	Metodologia	Resultados	Comentários
Tang et al. (2004)	Análise da eficácia de MIC	n=31	Solução salina estéril	Ca(OH) ₂ e sulfato de frameticina (Septomixine)	PCR/ hibridização	25 de 31 positivos para MO residuais após PQC e uma semana de MIC- 6 livres de bactérias	Uso de iniciadores para detectar bactérias
Horz et al. (2005)	Análise da redução microbiana após PQC e SQA	n=32	G1: NaOCl 2.5% G2: CHX 2%		qPCR/ cultura		Importância na escolha do primer universal, pois diferem em sua cobertura no domínio bactéria.
Vianna et al. (2006)	Análise da redução microbiana após PQC e SQA	n=32	G1: NaOCl 2.5% G2: gel de CHX 2%		qPCR	Redução (96%). NaOCl (SYBRGreen: 99.99%; TaqMan: 99.63%) significante maior que CHX (SYBRGreen: 96.62%; TaqMan: 96.60%). Cultura 75%-NaOCl; 50%-CHX estavam livre de bactérias e	Foi comparado em método de cultura e qPCR as sondas que mostrou melhores resultados no uso da TaqMan
Williams et al. (2006)	Detectaram e quantificaram <i>E. faecalis</i> pós PQC e pós MIC e compararam com os métodos de cultura e PCR.	n=29			qPCR/ RT-PCR/ cultura	<i>E. faecalis</i> 3 vezes mais prevalente em refratário em cada etapa.	qPCR e RT-PCR como métodos mais sensíveis do que cultura para a detecção de <i>E. faecalis</i> .

(Continua)

Autor	Objetivo	N	SQA	MIC	Metodologia	Resultados	Comentários
Sakamoto et al. (2007)	Análise da microflora e redução microbiana após PQC	n=18	NaOCl 2.5%	Pasta de hidróxido de cálcio/PMCC/glicerina	qPCR/ análise da biblioteca do clone	99.67% pós PQC e 99.85% pós MIC. (56%) -filitipos não cultiváveis. Sp <i>streptococci</i> mais prevalente.	Métodos moleculares fornece uma visão detalhada sobre efeitos de protocolos de antisepsia intracanal.
Siqueira et al. (2007a)	Análise da microflora e redução microbiana após PQC	n=12	NaOCl 2.5%	Pasta de hidróxido de cálcio/PMCC	PCR/sequenciamento e cultura	Redução significativa S1 e S2, S1 e S3 e S2 e S3 casos de cultura negativa (p=0.03).	Métodos moleculares identificam bactérias não cultiváveis
Vianna et al. (2008)	Análise da microflora e quantificação após PQC	n=24	CHX 2%	CHX M1- pasta de Ca(OH) ₂ M2- CHX 2% M3- pasta de Ca(OH) ₂ / CHX 2%	Hibridização Checkerboard/ cultura	S1: <i>Fusobacterium nucleatum</i> , ssp. <i>polymorphum</i> , <i>Treponema socranskii</i> ssp. <i>socranskii</i> , <i>Parvimonas micra</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> . Ausência de MO- CHX 2%- 7 dias.	Checkerboard não detecta bactérias abaixo de 10 ⁴ e cultura detecta viabilidade, mas não todas as espécies.
Blome et al. (2008)	Análise da microflora e quantificação após PQC	n=40		Ca(OH) ₂	qPCR	Infecções primárias abrigaram mais bactérias do que infecções secundárias Após preparo e curativo de demora foi significativamente reduzida em 95%.	Análise por PCR em tempo real permitiu a quantificação da contagem total de bactérias de nove espécies selecionadas.
Rôças e Siqueira (2010)	Análise da microflora e quantificação após PQC	n=15	NaOCl 2.5%	Pasta de Ca(OH) ₂ /PMCC /glicerina	RT-PCR e hibridização checkerboard com captura reversa	60% de bactérias pós PQC- 53% pós MIC.	Utilizou combinação de métodos moleculares. (Continuação)

Autor	Objetivo	N	SQA	MIC	Metodologia	Resultados	Comentários
Rôças e Siqueira (2011a)	Análise da microflora e quantificação após PQC	n=47	NaOCl 2.5% e CHX 0.12%		PCR e checkerboard captura reversa	PCR- S2 (40% para NaOCl versus 47% para CHX)	PCR identificou a presença de bactérias, archae e fungos, checkerboard identificou as espécies.
Rôças e Siqueira (2011b)	Análise da microflora e quantificação após PQC e MIC	n=24	NaOCl 2.5%	Ca(OH)2/PMCC /glicerina; Ca(OH)2/glicerina	PCR e checkerboard captura reversa	46% do S2 e 62.5% do S3 foram negativos no exame do PCR para bactérias. PCR negativo em 50% e 58% dos canais no grupo do CHG e em 42% e 67% dos canais no grupo do CHPG.	PCR identificou a presença de bactérias, archae e fungos, checkerboard identificou as espécies.
Ito et al. (2011)	Análise da microflora e quantificação após PQC	n=30		Pasta de Ca(OH)2/CHX 1%	Hibridização checkerboard e cultura	88.57%- estavam presentes 37.14%- pós MIC	Cultura para contagem de bactérias viáveis e checkerboard identificação
Endo et al. (2012)	Quantificaram bactérias cultiváveis e endotoxinas em canais radiculares pós PQC e	N=15	CHX 2%/ EDTA 17%		PCR/cultura/ LAL	Mais prevalentes: <i>Prevotella nigrescens</i> (4/15), <i>Prevotella intermedia</i> (2/15), e <i>Tannerella forsythia</i> (2/15). 100% de endotoxinas.	Detectou endotoxinas através de LAL. (Conclusão)

Tabela 5.3 - Iniciadores universais mais utilizados em estudos *in vivo* analisando a microbiota e antissepsia dos canais radiculares

Autor	Par de iniciador universal
Fouad et al. (2002)	(A)
Siqueira e Rôças (2003a)	Posição da base f- 8-27; r-1493–1513 <i>E. coli</i>
Siqueira e Rôças (2003b)	F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
Siqueira e Rôças (2004b)	R: 5'-ACG GCTACC TTG TTA CGA CTT-3'
Kaufman et al. (2005)	
Cogulu et al. (2007)	
Cogulu et al. (2008)	
Siqueira et al. (2003)	(B)
Rôças et al. (2004)	Posição da base f: 786-808 e r: 1369-1387 <i>E. coli</i>
Siqueira e Rôças (2004a)	F: 5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3'
Siqueira et al. (2007a)	R: 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Siqueira et al. (2007b)	
Rôças e Siqueira (2010)	
Nadkarni et al. (2002)	(C)
Horz et al. (2005)	Posição da base f: 331- 349 e r: 772-797 <i>E. coli</i>
Vianna et al. (2006)	F: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'
Sakamoto et al. (2007)	R: 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'
Endo et al. (2012)	
Sedgley et al. (2006a)	(D)
Sedgley et al. (2006b)	Posição da base 1020f- 1190r
Ozbek et al. (2009)	F: 5'-TTA AAC TCA AAG GAA TTG ACG G-3'
Ozbek e Ozbek (2010)	R: 5'-CTC ACG RCA CGA GCT GAC GAC-3'
Sakamoto et al. (2008)	(E)
Siqueira et al. (2009)	Posição da base 8f -1492r
Rôças e Siqueira (2011a)	F: 5'- AGA GTT TGA TYM TGG C-3'
Rôças e Siqueira (2011b)	R: 5'- GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3'
Rolph et al. (2001)	(F)
Siqueira e Rôças (2007)	Posição da base 27F- 1492R
	F: 5'-AGA GTT TGA TC [A/C] TGG CTC AG-3'
	R: 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
	(Conclusão)

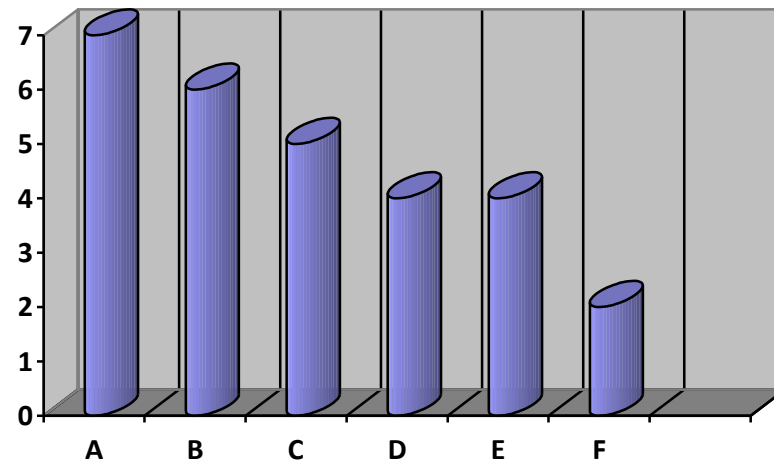


Figura 5.4- Gráfico dos iniciadores universais mais utilizados em estudos da microbiota e análise da capacidade de antissepsia dos canais radiculares

6 DISCUSSÃO

As lesões periapicais representam uma resposta inflamatória decorrente da presença de fatores de agressão, como endotoxinas, restos celulares e bactérias no interior do sistema de canais radiculares. Deste modo, a cura e o sucesso se baseiam na antissepsia e, neste particular, a identificação de bactérias orais e periodontais externas e estranhas tornam-se fundamental na instituição de uma terapia a ser empregada (Siqueira et al., 2003; Siqueira; Rôças, 2003a; Siqueira; Rôças, 2003b, Siqueira; Rôças, 2004a; Rôças et al., 2004; Kaufman et al., 2005).

Com esta preocupação, pode ser observado nos últimos anos um grande avanço nas pesquisas com o uso de técnicas moleculares, principalmente na identificação de microrganismos dentro do sistema de canais radiculares. Diversos autores relatam na literatura a grande confiabilidade que estes métodos proporcionam (Rolph et al., 2001; Gomes et al., 2006a; Sedgley et al., 2006a; Willians et al., 2006; Cogulu et al., 2007) podendo apresentar até 41 vezes mais sensibilidade quando comparados ao método de cultura com contagem de UFCs (Saito et al., 2009). Essa alta acurácia pode ser explicada pelo fato de que num ensaio utilizando PCR em tempo real (qPCR) é possível identificar alvos de DNA livre, células viáveis cultiváveis e vivas, mas ainda não-cultiváveis Sedgley et al. (2006b).

O método se baseia na replicação *in vitro* de DNA através de ciclos repetitivos de desnaturação, recozimento e extensão. Um dos avanços na tecnologia do PCR é o qPCR que combina a metodologia do PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência tendo como vantagens: rapidez e diminuição na contaminação dos ácidos nucleicos, Ozbek et al. (2009).

Os estudos *in vivo* são considerados de grande importância no universo científico, todo conhecimento originado de pesquisas *in vitro* e *in vivo*, devem ser aplicados em adição aos estudos clínicos randomizados.

Sob o ponto de vista metodológico, na tabela 5.1 observamos diversos métodos moleculares para identificação e presença bacteriana e o mais utilizado foi o PCR (Siqueira et al., 2003; Rôças et al., 2004; Siqueira; Rôças, 2004a; Siqueira; Rôças, 2005; Kaufman et al., 2005; Cogulu et al., 2008; Gomes et al., 2008). Muitas vezes este método foi associado a outros, tais como: sequenciamento (Rolph et al.,

2001; Fouad et al., 2002; Siqueira; Rôças, 2006; Siqueira; Rôças, 2007; Vianna et al. 2007; Fujii et al., 2009; Schirrmeister et al., 2009; Subramanian; Mickel 2009), a hibridização checkerboard captura reversa (Siqueira et al. 2009), e cultura (Gomes et al., 2006a; Sedgley et al., 2006a; Cogulu et al., 2007) estas associações promovem uma maior sensibilidade na detecção dos patógenos e na identificação de filotipos ainda não cultiváveis.

Outras combinações foram relatadas: o uso do nested e semi-nested PCR, neste caso é realizada mais de uma reação no PCR com a proposta de conferir uma maior especificidade e eficiência na análise das amostras (Siqueira; Roças, 2003a; Siqueira; Rôças, 2003b; Siqueira; Rôças, 2004b; Gomes et al., 2006b; Siqueira; Rôças, 2006; Gomes et al., 2007; Siqueira; Rôças, 2007; Sakamoto et al., 2008). Outro método bastante utilizado foi o qPCR (Ozbek et al., 2009; Saito et al. 2009; Ozbek; Ozbek, 2010), ademais pode ser realizado em associações, neste particular Vianna et al., 2007 e Subramanian e Mickel, 2009 detectaram espécimes até então não registrados no sistema de canais radiculares.

O preparo químico-cirúrgico tem como objetivo a modelagem e a sanificação dos sistemas de canais radiculares. Este ponto é de fundamental importância, pois dependendo do grau de contaminação, das variáveis anatômicas, dos diâmetros dos tubulos dentinários e do tempo de instalação da infecção, os ensaios relacionados a antissepsia dos sistemas de canais radiculares demonstram a permanência dos patógenos mesmo após o preparo químico-cirúrgico bem como após o uso de medicação intracanal (Tabela 5.2) (Tang et al., 2004; Horz et al., 2005; Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Siqueira et al., 2007a; Blome et al., 2008; Vianna et al., 2008; Roças; Siqueira, 2010; Ito et al., 2011; Rôças; Siqueira, 2011a,b; Endo et al., 2012).

Sob o ponto de vista metodológico os estudos *in vivo* que estão relacionados com a quantificação da carga bacteriana após o preparo químico cirúrgico, o qPCR foi o mais empregado (Vianna et al., 2006; Willians et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008), no que se refere a identificação da microbiota residual a hibridização/ checkerboard foi amplamente utilizada (Tang et al., 2004, Vianna et al., 2008; Rôças; Siqueira, 2010; Ito et al., 2011; Rôças; Siqueira, 2011a,b).

Frente ao uso dos iniciadores universais é importante observar os mais utilizados na detecção das bactérias presentes, devem ser os mais abrangentes possíveis a fim de evitar discrepâncias na leitura do fragmento alvo, evitando assim

erros inerentes a amostragem (Nadkarni et al., 2002). Tendo isto em mente, cuidado adicional deve ser tomado na escolha de um iniciador universal e na tabela 5.3 estão dispostos os mais utilizados na literatura e no gráfico 5.4 onde observamos em comparação com outros descritos. Essas sequências da cadeia de nucleotídeos estão inseridas em banco de dados de domínio público dispostos em diferentes sites, onde estão armazenadas sequências das cadeias de DNA, RNA, proteínas e genes.

Após a análise literária, observamos a necessidade da realização de novos experimentos, tanto laboratoriais como ensaios clínicos, quanto ao emprego dessas metodologias no que tange a capacidade de antissepsia dos sistemas de canais radiculares.

7 CONCLUSÃO

Sob o ponto de vista crítico da literatura seria lícito concluirmos que:

1. O método molecular mais utilizado para identificação da diversidade e presença microbiana no sistema de canais radiculares foi o PCR.
2. O método molecular mais utilizado para quantificação da carga bacteriana após o PQC foi o qPCR.

3. O iniciador universal mais descrito na literatura foi:

Posição da base F- 8-27; R-1493–1513 *E. coli*

F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

R: 5'-ACG GCTACC TTG TTA CGA CTT-3'

REFERÊNCIAS¹

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct; 23(5):384-90.

Cogulu D, Uzel A, Oncag 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 Oct;1(4):216-21.

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

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 May 8;17(5):370-4.

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 Sep;40(9):3223-31.

Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa K-I, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Dec;24(6):502-5.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006b Oct;32(10):937-40.

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

¹De acordo com Estilo Vancouver.

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

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, 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.* 2006a Aug;102(2):247-53.

Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Conrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5332-7.

Ito Y, Matoba JR F, Paula-Silva FWG, Silva LAB, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA–DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre and post endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent.* 2011 Sep;21(5):353-60.

Kaufman B, Spångberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod.* 2005 Dec;31(12):851-6.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology.* 2002 Jan;148(Pt 1):257-66.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan 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 Sep-Oct 17(5):370-4.

Ozbek SM, Ozbek A. Real-time polymerase chain reaction of “red complex” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Nov;110(5):670-4.

Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod.* 2004 Jul;30(7):504-8.

Rôças IN, Siqueira-Jr JF. Comparison of the *in vivo* antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: A molecular microbiology study. *J Endod.* 2011a Feb;37(2):143-50.

Rôças IN, Siqueira-Jr JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase–polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):45-52.

Rôças IN, Siqueira- Jr JF. *In vivo* antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011b Mar;37(3):304-10.

Rôças IN, Siqueira-Jr JF, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1206-12.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3282-9.

Saito D, Coutinho LL, Saito CPB, Tsai SM, Hofling JF, Gonçalves RB. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2009 Nov;35(11):1518-24.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Feb;22(1):19-23.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):275-81.

Schirrmester JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):169-74.

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006a Feb;32(2):104-9.

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analysis of *Enterococcus faecalis* in root canals. J Endod. 2006b Mar;32(3):173-7.

Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. J Endod. 2007a Jun;33(6):667-72.

Siqueira-Jr JF, Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. Int Endod J. 2003a Mar;36(3):174-80.

Siqueira-Jr JF, Rôças IN. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Aug;102(2):259-64.

Siqueira –Jr JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1—Current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005 Jun;31(6):411-23.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Molecular detection and identification of *Synergistes* phylotypes in primary endodontic infections. Oral Dis. 2007 Jul;13(4):398-401.

Siqueira-Jr JF, Rôças IN. Nested PCR Detection of *Centipeda periodontii* in Primary Endodontic Infections. J Endod. 2004b Mar;30(3):135-7.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. Arch Oral Biol. 2003b Jul;48(7):495-502.

Siqueira-Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004a Jan;97(1):85-94.

Siqueira-Jr JF, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 May;107(5):721-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Andrade AF, de Uzeda M. Peptostreptococcus micros in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. J Endod. 2003 Feb;29(2):111-3.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. Oral Microbiol Immunol. 2007b Aug;22(4):266-71.

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. J Endod. 2009 Jul;35(7):950-7.

Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. Oral Dis. 2004 Nov;10(6):389-97.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Quantification and characterization of Synergistes in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2007 Aug;22(4):260-5.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. Oral Microbiol Immunol. 2008 Aug;23(4):282-90.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006 Jun;39(6):484-92.

Williams JM, Trope Martin, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. J Endod. 2006 Aug;32(8):715-21.

Zoletti GO, Carmo FL, Pereira EM, Rosado AS, Siqueira-Jr JF, Santos KRN. Comparison of endodontic bacterial community structures in root-canal-treated teeth with or without apical periodontitis. J Med Microbiol 2010 Nov;59(Pt 11):1360-4.

APÊNDICE A - Iniciadores universais utilizados nos estudos de identificação e quantificação da microbiota nos sistemas de canais radiculares infectados

Autor	Iniciador universal
Rolph et al. (2001)	Posição da base 27F- 1492R F: 5'-AGA GTT TGA TC [A/C] TGG CTC AG-3' R: 5'-TAC GG[C/T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
Nadkarni et al. (2002)	F: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3' R: 5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'
Fouad et al. (2002)	F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' F: 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT- 3'
Siqueira et al. (2003)	Ubiquitous primers F: 5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' R: 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Siqueira e Rôças (2003a)	Posição da base F- 8-27; R-1493–1513 <i>E. coli</i> F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' F: 5'-ACG GCTACC TTG TTA CGA CTT-3'
Siqueira e Rôças (2003b)	Posição da base F- 8-27; R-1493–1513 <i>E. coli</i> F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' F: 5'-ACG GCTACC TTG TTA CGA CTT-3'
Rôças et al. (2004)	Ubiquitous primers F: 5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' R: 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Siqueira e Rôças (2004a).	Ubiquitous primers F: 5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' R: 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Siqueira e Rôças (2004b).	Posição da base F- 8-27; R-1493–1513 <i>E. coli</i> F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' F: 5'-ACG GCTACC TTG TTA CGA CTT-3'
Kaufman et al. (2005)	Posição da base F- 8-27; R-1493–1513 <i>E. coli</i> F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' F: 5'-ACG GCTACC TTG TTA CGA CTT-3'
Sedgley et al. (2006a)	Posição da base 1020f- 1190r F: 5'-TTA AAC TCA AAG GAA TTG ACG G-3' R: 5'-CTC ACG RCA CGA GCT GAC GAC-3'
Sedgley et al. (2006b)	Posição da base 1020f- 1190r F: 5'-TTA AAC TCA AAG GAA TTG ACG G-3' R: 5'-CTC ACG RCA CGA GCT GAC GAC-3'
Gomes et al (2006a)	Posição da base 785-422 16S- GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC 23S- GGA GTA TTT AGC CTT
Gomes et al. (2006b)	16S/F: GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC 23 S/F: GGA GTA TTT AGC TT (Continua)

Gomes et al. (2007)	16S/F: 5'- GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC 23S/F: 5'- GGA GTA TTT AGC TT
Cogulu et al. (2007)	F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' F: 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'
Vianna et al. (2007)	F: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' R: 5'- GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
Siqueira et al. (2007b)	Posição da base F: 786–808 e R:1369–1387- <i>E. coli</i> 5'- GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' 5'- CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Gomes et al. (2007)	Posição da base 785 -422 16S- GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC 23S- GGA GTA TTT AGC CTT
Cogulu et al. (2008)	F: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' R: 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'
Sakamoto et al. (2008)	Posição da base 8f -1492r F: 5'- AGA GTT TGA TYM TGG C-3' R: 5'- GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3'
Subramanian e Mickel (2009)	Posição da base 785f-1512r - <i>E. coli</i> F: 5'- GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC-3' R: 5'- TAC CTT GTT ACG ACT T- 3' Posição da base 422 23S- GGA GTA TTT AGC CTT
Saito et al. (2009)	Posição da base- 1528-1710 - <i>E. coli</i> F: 5'- CAG TTG TCT CAG TTC ATG GAC C-3' R: 5'-ACC GAT GTT TGG ACC TTC AG-3'
Ozbek et al. (2009)	Ubiquitous primers F: 5'- TTA AAC TCA AAG GAA TTG ACG G-3' R: 3'- CTC ACG ACA CGA GCT GAC GAC 3'
Schirrmeister et al. (2009)	F: 5'- AGA GTT TGA TC[C/A] TGG CTC AG-3' R:5'- ATT GTA GCA CGT GTG T[A/C]G CCC-3'
Siqueira et al. (2009)	Posição da base 8f -519r e 515f -1492r – <i>E. coli</i> F: 5'- AGA GTT TGA TYM TGG C-3' R: 5'- GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3' F: 5'- GTG CCA GCA GCC GCG GTM A- 3' R: 5'-GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3'
Ozbek e Ozbek (2010)	Posição da base 1020f- 1190r F: 5'-TTA AAC TCA AAG GAA TTG ACG G-3' R: 5'-CTC ACG RCA CGA GCT GAC GAC-3'
Zoletti et al. (2010)	Posição da base 968f - 1401r F: 5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3' R: 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'
Rôças et al. (2011)	Posição da base 8f- 519r- <i>E. coli</i> F: 5'-AGA GTT TGA TYM TGG C-3' R: 5'- GTR TTA CCG CGG CTG CTG-3' (Continuação)

Posição da base 515- 1492- *E. coli*
F: 5'- GTG CCA GCA GCC GCG GTM A- 3'
R: 5'-GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3'

(Conclusão)

APÊNDICE B – Primers e sondas utilizadas nos estudos analisando a capacidade de redução bacteriana após o preparo químico mecânico

Autor	Iniciador universal
Tang et al. (2004)	Posição da base f: 70–90 e r: 1037–1054 F: 5'- GGG TGA GTA ACA CGT GAG TAA-3' R: 5'- CGA GCT GAC GAC AAC CAT- 3'
Horz et al. (2005)	Posição da base f: 331- 349 e r: 772-797 <i>E. coli</i> F: 5'- TCC TAC GGG AGG CAG CAG T -3' R: 5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'
Vianna et al. (2006)	Posição da base f: 331- 349 e r: 772-797 <i>E. coli</i> F: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3' R: 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'
Sakamoto et al. (2007)	Posição da base f: 331- 349 e r: 772-797 <i>E. coli</i> F: 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3' R: 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'
Siqueira et al. (2007a)	Posição da base f: 786-808 e r: 1369-1387 <i>E. coli</i> F: 5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' R: 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Rôças e Siqueira (2010)	Posição da base F: 786–808 e R:1369–1387- <i>E. coli</i> 5'- GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3' 5'- CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3'
Rôças e Siqueira (2011a)	Posição da base 8f- 1492r F: 5'- AGA GTT TGA TYM TGG C- 3' R: 5'- GYT ACC TTG TTA CGA CTT- 3'
Rôças e Siqueira (2011b)	Posição da base 8f- 1492r F: 5'- AGA GTT TGA TYM TGG C- 3' R: 5'- GYT ACC TTG TTA CGA CTT- 3'
Endo et al. (2012)	F: 5'- TCC TAC GGG AGG CAG CAG T- 3' R: 5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT- 3'