

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrícia Farnese Lacerda

**ETIOPATOGENIA DAS
ALTERAÇÕES
PULPOPERIRRADICULARES**

BELO HORIZONTE

2010

PATRÍCIA FARNESE LACERDA

**ETIOPATOGENIA DAS ALTERAÇÕES
PULPOPERIRRADICULARES**

Monografia de conclusão do curso de especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de especialista.

Orientador: Prof^a. Sandra Maria de Melo Maltos

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2010**

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 5 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 7 |
| 2.1 HISTÓRICO..... | 7 |
| 2.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE BACTÉRIA NO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES INFECTADO..... | 9 |
| 2.3 MICROBIOTA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES INFECTADO..... | 12 |
| 2.4 MICROBIOTA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES COM INFECÇÃO PERSISTENTE E SECUNDÁRIA..... | 26 |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 38 |
| 4 REFERÊNCIAS | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| SCR | Sistema de Canais Radiculares |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| BPPN | Bactérias Produtoras de Pigmento Negro |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| RNA | Ácido Ribonucleico |

RESUMO

O papel dos microrganismos na etiopatogenia das lesões endodônticas tem sido intensamente investigado. Os avanços nas técnicas de cultura e o advento dos métodos moleculares permitiram a identificação de novos patógenos, assim como a reclassificação de algumas espécies. A composição da microbiota endodôntica varia de acordo com o tipo de infecção presente no sistema de canais radiculares (SCR). A infecção endodôntica primária é polimicrobiana, com predomínio de anaeróbios obrigatórios. A infecção endodôntica secundária ou persistente caracteriza-se por uma menor variedade microbiana quando comparado com a infecção primária e aproximadamente igual proporção de anaeróbios facultativos e obrigatórios. Sendo assim, o objetivo da terapia endodôntica é a eliminação/redução dos microrganismos presentes nos SCR infectados, prevenindo a sua recolonização.

1 INTRODUÇÃO

A importância dos microrganismos como principais responsáveis pelas alterações patológicas de origem endodôntica está bem demonstrada na literatura (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007; KAKEHASHI *et al.*, 1965; MUNSON *et al.*, 2002; SIREN *et al.*, 1997; SUNDQVIST, 1976, 1992a b, 1998).

Quando os microrganismos da microbiota normal acessam os tecidos normalmente estéreis, tais como polpa dental ou tecido perirradicular, eles se tornam patógenos oportunistas induzindo uma resposta do hospedeiro que pode ser tanto uma inflamação não específica e/ou uma reação imunológica específica. A infecção endodôntica é um resultado do efeito patogênico das bactérias e da resposta do hospedeiro (BAUMGARTNER, 2004).

A infecção microbiana na cavidade pulpar freqüentemente é resultante da cárie dental e é considerada de natureza polimicrobiana. E, pode-se ainda observar, com a utilização de metodologias apropriadas, que uma verdadeira infecção endodôntica é constituída, em sua maioria, por espécies anaeróbias estritas (SUNDQVIST, 1976).

Estima-se que na cavidade oral existam mais de 700 espécies bacterianas, sendo que destas, mais de 50%, atualmente, não são cultiváveis (AAS *et al.*, 2005; PASTER *et al.*, 2001). No entanto, as espécies bacterianas presentes nos SCR infectados incluem um grupo restrito de espécies, comparadas à microbiota oral. Isso se deve a mecanismos seletivos que operam no interior do SCR, favorecendo o crescimento de algumas espécies, e limitando o de outras. Essa seleção estabelece uma predominância de bactérias anaeróbias estritas em relação às facultativas (FABRICIUS *et al.*, 1982a, b).

A ocorrência de fungos nos SCR infectados é relatada por estudos empregando cultura microbiológica, microscopia óptica e eletrônica ou métodos moleculares. Os fungos são patógenos

oportunistas e a espécie *Candida albicans* é a espécie mais comumente associada à infecção, em humanos. Embora os fungos sejam apenas ocasionalmente encontrados em infecções endodônticas primárias, estes microrganismos são mais freqüentemente isolados de casos de infecções endodônticas secundárias ou persistentes, muitas das vezes associados ao fracasso da terapia endodôntica (LOPES e SIQUEIRA, 2004).

O conhecimento de quais microrganismos coloniza o SCR e a sua eliminação/redução é determinante para o sucesso da terapia endodôntica. Sendo assim, o principal objetivo de todos os estágios da terapia endodôntica é a eliminação/redução do número de microrganismos presentes no interior do SCR infectado, impedindo desta forma a sua proliferação (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Tendo em vista a importância dos microrganismos nas infecções endodônticas, este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão de literatura abrangendo os principais aspectos microbiológicos das alterações patológicas da polpa e dos tecidos periapicais, em infecções endodônticas primárias e secundárias ou persistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O papel dos microrganismos como principais responsáveis pelas alterações patológicas de origem endodôntica tem sido intensamente relatada na literatura e foi primeiramente observado por Miller em 1894 em polpa inflamada ao examinar esfregaços do conteúdo de canais radiculares. Ele verificou uma grande variedade de formas bacterianas nestas polpas inflamadas. No entanto, apenas uma minoria dessas bactérias era cultivável.

Takehashi *et al.* (1965) demonstraram que as bactérias são responsáveis pelas alterações patológicas na polpa dental e periápice, quando expuseram polpas dentais de ratos convencionais e de ratos isentos de germes ao meio bucal e analisaram a resposta pulpar por meio de métodos histológicos. As polpas dentais de ratos convencionais mostraram sinais de inflamação ou necrose pulpar e formação de abscesso nas áreas periapicais. As polpas dentais de ratos isentos de germes não sofreram necrose, nenhum abscesso foi encontrado e houve formação de pontes de dentina reparadora isolando a exposição pulpar do meio bucal.

Sundqvist (1976) realizou uma pesquisa que é referência para o estudo da microbiota do SCR infectado. Neste estudo ele avaliou 32 dentes traumatizados, com canais radiculares únicos, apresentando polpa necrótica e coroas íntegras. Utilizou uma metodologia apropriada para recuperação de bactérias anaeróbias, as quais foram isoladas apenas dos canais radiculares de dentes portadores de lesão periapical. Destes canais foram isoladas 88 variedades bacterianas, sendo que 90% dessas eram bactérias anaeróbias estritas, representando a mais alta porcentagem de anaeróbios, até então recuperada, de canais radiculares portadores de polpas necróticas. A identificação dos microrganismos evidenciou as seguintes presenças: *Eubacterium alactolyticum*,

Propionibacterium acne, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvulla*, *Arachnia propionica*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Peptostreptococcus micros*. Os *Bacteroides melaninogenicus* estiveram presentes em todos os casos em que houve processo agudo.

Todos os conhecimentos obtidos neste campo, a partir da década de setenta, se refletiram também na prática da endodontia, através de novos conceitos no tratamento do SCR (DE DEUS, 1992).

Necessário também é se ter conhecimento da taxonomia da microbiota do SCR, pois possibilita descobrir qual bactéria ou combinações bacterianas são importantes na progressão das patologias pulpares e periapicais; além da descoberta de bactérias que podem ser resistentes a terapia convencional e aquelas relacionadas ao insucesso da terapia endodôntica (SUNDQVIST 1994).

2.2 Métodos de detecção de bactérias no sistema de canais radiculares infectado

Ainda hoje, os pesquisadores procuram aperfeiçoar os métodos de recuperação microbiana do SCR infectados por meios de cultura microbiológica, microscopia de campo escuro, microscopia eletrônica, métodos histológicos (coloração de Brown e Brenn) e técnicas de biologia molecular (Reação em Cadeia de Polimerase – PCR).

A microbiota associada com as infecções endodônticas é bem mais diversa do que tem sido previamente mostrada pelos métodos de cultura. Esses métodos podem não conter os nutrientes necessários para o crescimento de determinadas espécies, ou o crescimento mais lento de algumas espécies pode ser inibido por produtos metabólicos daquelas que crescem rapidamente. Além disso, alguns microrganismos são completamente dependentes de outros para o seu desenvolvimento (MUNSON *et al.*, 2002).

As técnicas bacteriológicas foram aperfeiçoadas e permitiram o cultivo de um maior número de microrganismos da cavidade oral. Os métodos utilizados para recuperação de espécies anaeróbias estritas foram desenvolvidos, nos quais esses microrganismos eram protegidos da exposição ao oxigênio durante as várias fases de trabalho laboratorial. Quando estas técnicas foram aplicadas às amostras endodônticas, detectou-se um predomínio de bactérias anaeróbias obrigatórias associadas às infecções do SCR (SUNDQVIST, 1976).

Os resultados de estudos anteriores são questionados devido à desvantagem do cultivo inicial das amostras, aumentando a probabilidade de se recuperar somente bactérias de rápido crescimento (SUNDQVIST, 1994).

Tradicionalmente, a identificação bacteriana tem incluído cultura em meios sólidos ou líquidos e identificação baseado em métodos bioquímicos, mas estes procedimentos são trabalhosos,

dispendiosos e consomem muito tempo. Na última década, tem-se utilizado os métodos moleculares para identificar bactérias em amostras clínicas. Esses métodos vêm se mostrando rápidos, sensíveis e apurados permitindo a detecção de organismos mais exigentes e que às vezes são impossíveis de cultura (TOMAZINHO e CAMPOS, 2007).

O método PCR é utilizado para identificar uma variedade de microrganismos, incluindo patógenos endodônticos e periodontais (TOMAZINHO e CAMPOS, 2007).

Muitas das espécies que são relatadas como novas são divisões de um gênero ou espécies previamente estabelecidos. A facilidade de identificação de espécies de difícil cultura e a especificidade dos métodos moleculares, tem significado na inclusão de novas espécies na microbiota do SCR infectados (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007).

As bactérias anaeróbias produtoras de pigmento negro (BPPN) são um exemplo disso. Inicialmente, todas as espécies anaeróbias que produziam pigmento negro eram classificadas como *Bacteriodes melaninogenicus*. Esta espécie foi sendo dividida e já se tem oito diferentes espécies que podem estar presentes nas amostras orais humanas. As produtoras de pigmento negro sacarolíticas foram reclassificadas como *Prevolla* e as assacarolíticas em *Porphyromonas*. Outra bactéria que foi transferida de um gênero para outro é *Arachnia propionica*, que era membro do gênero *Arachnia* e agora está incluída no gênero *Propionibacterium* como *Propionibacterium propionicum* (SUNDQVIST, 1994).

A *Porphyromonas gingivalis* é considerada um dos principais patógenos periodontais e a sua prevalência em infecções endodônticas é relativamente baixa quando avaliada por método de cultura (SUNDQVIST, 1989). Utilizando método molecular, os estudos constataram uma relativa alta prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em canais radiculares infectados associados à patologia

perirradicular (SAITO *et al.*, 2009; SEOL *et al.*, 2006; TOMAZINHO e CAMPOS, 2007).

Apesar dessa contribuição, reconhecem-se os limites desse método. A sua alta sensibilidade implica que é essencial a aplicação rigorosa de um controle quanto a uma possível contaminação. A técnica PCR é baseada no reconhecimento da seqüência de genes e não na recuperação de células cultiváveis capazes de crescimento. Sendo assim, a principal desvantagem do método PCR é a detecção tanto de bactérias vivas quanto mortas. Devido ao fato do DNA persistir após a morte celular e ser detectado pela técnica PCR, os achados das amostras coletadas do SCR infectado pode revelar mais bactérias ativas devido à persistência do DNA, refletindo assim os microrganismos que estavam presentes no SCR (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007).

Os métodos de cultura também têm suas limitações, na qual incluem alto grau de habilidade, esforço e tempo para identificação das espécies, além de que algumas espécies são de difícil ou impossível cultura *in vitro*. Tanto o método molecular quanto o de cultura contribuem para o estudo da microbiota presente no SCR infectado (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007).

No estudo de Munson *et al.* (2002) onde foram coletadas amostras de dentes portadores de periodontite apical crônica, de cinco pacientes, com evidência radiográfica de destruição óssea, o número médio de espécies recuperadas em cada amostra foi de 20.2 combinando os métodos de cultura e de análise molecular, e de 12.6 utilizando-se somente o método de cultura.

Estudos anteriores têm recuperado de 1 a 12 espécies por amostra pelo método de cultura (MUNSON *et al.*, 2002; SUNDQVIST, 1976; SUNDQVIST, 1992a, b; SUNQVIST *et al.*, 1989).

2.3 Microbiota do sistema de canais radiculares infectado

A polpa dentária e os tecidos periapicais são estéreis sob o aspecto microbiológico em condições sadias. Assim, a presença de microrganismos nesses tecidos é um referencial sugestivo de doença. As possíveis vias de acesso podem ser os túbulos dentinários, onde os microrganismos decorrentes da expansão do processo carioso invadem estes túbulos no sentido centrípeto podendo atingir a polpa dentária; pela exposição pulpar ao ambiente oral seja por motivo de trauma ou iatrogenia; pela membrana periodontal os microrganismos do sulco gengival também podem atingir a câmara pulpar, utilizando um canal lateral ou o forame apical. Outra via de colonização da polpa é a corrente sanguínea. A utilização dessa via está na dependência da ocorrência de bacteremia e septicemia sendo favorecida pelo fenômeno denominado de anacorese, que consiste na localização de microrganismos em áreas do hospedeiro que apresentem, previamente, resistência diminuída fortalecendo os mecanismos do agressor. A última via de infecção considerada é a extensão onde os microrganismos a partir de dentes infectados e em consequência de contigüidade tecidual, chegariam até canal principal e/ou lateral e se localizariam na polpa de dentes sadios; nessa possibilidade, o reservatório microbiano está representado pela infecção periapical de um dente adjacente (ESTRELA, 2004).

Estudos utilizando microscopia óptica e/ou eletrônica são efetuados para investigar a organização e a estrutura da microbiota infectante do SCR. Enquanto a maioria dos membros da microbiota endodôntica encontra-se usualmente em suspensão na fase fluida do canal radicular, grandes aglomerações de células bacterianas podem também ser vistas aderidas às paredes do canal radicular, muitas vezes formando estruturas semelhantes a biofilmes de multicamadas e multiespécies. Em muitos casos, os microrganismos são

encontrados em uma estrutura que sugere o estabelecimento de uma comunidade clímax, onde o consórcio microbiano encontra-se em equilíbrio com seu microambiente e cada espécie exerce uma função importante para a manutenção da comunidade. Essas bactérias também podem ser visualizadas no interior dos túbulos dentinários. A infecção intratubular não é uniforme; enquanto alguns túbulos podem ser densamente infectados, outros, túbulos adjacentes, mantêm-se livres de infecção. Tanto os cocos quanto os bacilos podem invadir os túbulos. As bactérias são capazes de realizar divisão celular no ambiente intratubular, indicando a presença de nutrientes no interior dos túbulos (LOPES e SIQUEIRA, 2004).

O número de espécies bacterianas no SCR infectado pode variar de uma para mais de doze e o número de células bacterianas varia de 10^2 a 10^8 unidade formadora de colônia (UFC). Parece existir uma correlação entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies de bactérias e de células bacterianas no SCR. Dentes com lesões grandes, usualmente abrigam maior número de espécies e têm maior densidade de bactérias do que dentes com pequenas lesões (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007; SUNDQVIST, 1992a).

As bactérias anaeróbias têm um importante papel na origem da infecção odontogênica. Os cocos anaeróbios gram positivos são encontrados em aproximadamente 87% de todas as infecções odontogênicas e as espécies gram negativas em aproximadamente 10% (UMEMOTO, 1995).

A microbiota do sistema do SCR infectado não tratado é tipicamente polimicrobiana com aproximadamente igual proporção de espécies gram positivas e gram negativas, dominadas por anaeróbios obrigatórios (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007).

Sundqvist (1976) em seu estudo com dentes necrosados encontrou a presença de *Bacteroides melaninogenicus*, que são anaeróbios produtores de pigmento negro, em todos os dentes portadores de inflamação periapical aguda. A prevalência de algumas dessas espécies no SCR infectado pode ter sido subestimada

naqueles estudos onde se utilizaram o método de cultura para análise microbiológica, uma vez que estas espécies bacterianas são de difícil ou mesmo impossível cultivo. Recentemente, vários estudos vêm analisando a presença destas espécies bacterianas nas infecções endodônticas (ROÇAS e SIQUEIRA, 2009; SEOL *et al.*, 2006; TOMAZINHO e CAMPOS, 2007; XIA *et al.*, 2000).

Sundqvist *et al.* (1989) avaliaram 72 dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Neste estudo mais de 90% das bactérias isoladas, pelo método de cultura utilizado, eram anaeróbias. As espécies mais frequentemente encontradas foram *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteróides intermedius*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium lentum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Wolinella recta*. As BPPN foram recuperadas em 30% dos SCR infectados e dentre elas estão principalmente *B. intermedius*, *B. endodontalis* e em menor quantidade *B. buccae*, *B. gracilis*, *B. loeschei*, *B. gingivalis*, *B. denticola*, *B. oralis*. A infecção nestes canais era polimicrobiana e o número de bactérias foi alto nos canais que continham BPPN e um pouco menor nos canais que não continham estas bactérias. Dos 22 dentes que continham BPPN, 16 tinham ou desenvolveram abscesso apical e apresentavam exsudação purulenta. Estes resultados sugerem que as BPPN estão envolvidas no desenvolvimento do abscesso apical e na drenagem via canal radicular e que, a exsudação purulenta na região apical pode ser induzida por combinações específicas de bactérias no SCR.

As espécies mais frequentemente isoladas do SCR infectado segundo Sundqvist (1994) foram o *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Peptostreptococcus micros* e *Peptostreptococcus anaerobius*. Essas espécies estavam presentes em mais de um terço das amostras e frequentemente foram encontradas associadas. Das BPPN, a *Prevotella intermedia* foi a mais comum, seguida da *Prevotella loescheii* e *Prevotella dentícola*. Das BPPN assacarolíticas a *Porphyromonas endodontalis* foi recuperada mais freqüentemente que a *Porphyromonas gingivalis*.

Eubacteria estava frequentemente presente no SCR infectado enquanto que, *E. alactolyticum* e *E. lentum* foram recuperadas em um terço dos canais. Também foi encontrado espécies de *Actinomyces*, principalmente *Actinomyces israelii*.

Existem fatores que podem influenciar o crescimento bacteriano e a sua colonização no SCR. Dentre esses se tem a disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio presente no SCR com polpas necróticas além das interações bacterianas, que podem ser cooperativas (sinergismo) ou competitivas (produção de substâncias antagonistas). O ambiente endodôntico é um habitat seletivo que permite o desenvolvimento de proporções específicas da microbiota anaeróbia (SUNDQVIST 1992a, b). Esse pesquisador analisou as associações entre espécies bacterianas isoladas dos SCR de dentes com lesões periapicais. Observou também, que a espécie mais freqüentemente isolada foi o *Fusobacterium nucleatum* (48%) estando associado positivamente, com *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Campylobacter rectus*. *Prevotella intermedia* estava presente em 34% dos casos e associou-se positivamente com *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius* e espécies de *Eubacterium*. *Eubacterium* associava-se positivamente, com espécies de *Peptostreptococcus*, enquanto *Porphyromonas endodontalis* associou-se, positivamente, com *Fusobacterium nucleatum*.

Siqueira *et al.* (1998) injetaram, via subcutânea, em ratos machos com peso entre 20 e 25g espécies bacterianas de *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus magnus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Eubacterium alactolyticum* para avaliarem a sua virulência. As espécies bacterianas foram testadas em monocultura e combinadas com *Prevotella intermedium* ou *Prevotella nigrescens*. A

patogenicidade em monocultura estava associada às *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus magnus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus anginosus*, *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces naeslundii*. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre essas espécies em monocultura ou associada à *Prevotella intermédia* ou *Prevotella nigrescens*. O sinergismo entre as espécies bacterianas foi observado quando se associou *Porphyromonas endodontalis* com *Prevotella intermédia* ou *Prevotella nigrescens*, visto que estas espécies não foram patogênicas em monocultura, mas foram quando associadas.

Xia *et al.* (2000) analisaram 118 amostras obtidas de pacientes com canais radiculares infectados, abscesso facial e celulites, de origem endodôntica. Utilizaram o método molecular PCR para detectar a presença de *Prevotella tanneriae*, a qual foi recuperada em 60% das amostras. Nos casos de abscesso, esta bactéria foi encontrada em 61%, nos casos de celulite em 68% e nos casos de canal radicular infectado em 50%. Estes achados sugerem que *Prevotella tanneriae* está comumente presente em infecções endodônticas, podendo ser um potencial patógeno.

Munson *et al.* (2002) avaliaram dentes de cinco pacientes com periodontite apical crônica e destruição óssea periapical evidenciada pelo exame radiográfico. Eles utilizaram, neste estudo, a análise molecular e os meios de cultura para recuperarem amostras de bactérias tanto aeróbias quanto anaeróbias do SCR desses dentes. Os aeróbios e facultativos foram minoria nas amostras. As bactérias anaeróbias encontradas foram agrupadas nos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*. No filo *Bacteroidetes* encontraram *Bacteróides forsythus*, *Prevotella buccae*, *Prevotella denticola*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oris*, *Prevotella oulorum*, *Prevotella tanneriae*. No filo *Actinobacteria* encontraram *Atopobium parvulum*, *Atopobium rimae*, *Olsenella uli*, *Olsenella profusa*, *Propionibacterium acnes*,

Slackia exígua. Dentro do *Fusobacteria* estão *Fusobacterium nucleatum* ss. *nucleatum* e *vincentii*. Dentro do *Firmicutes* estão *Bulleidia extracta*, *Clostridiales*, *Dialister*, *Eubacteriaceae*, *Eubacterium brachy*, *Eubacterium minutum*, *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium saphenum*, *Eubacterium sulci*, *Filifactor alocis*, *Firmicutes*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillus catenaformis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Megasphaera*, *Mogibacterium timidum*, *Mogibacterium vescum*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcus lacrimalis*, *Peptostreptococcus micros*, *Selenomonas sputigena*, *Solobacterium moorei*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*. No filo *Proteobacteria* estão *Campylobacter gracilis* e *Neisseria sicca*. Em seus achados houve domínio de anaeróbios gram positivo do filo *Firmicutes*. Não foi encontrada nenhuma espécie de *Porphyromonas*, uma vez que neste estudo só foram incluídos dentes com lesões crônicas e esta espécie tem sido comumente associada aos processos agudos.

Seol *et al.* (2006) coletaram amostras de 36 canais radiculares infectados de dentes com rarefação apical e quatro amostras de aspirações de abscesso periapical de origem endodôntica. Utilizaram os métodos de cultura e molecular de PCR para detecção das seguintes espécies bacterianas produtoras de pigmento negro: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella tanneriae*. Pelo método PCR foi possível detectar pelo menos uma das cinco espécies produtoras de pigmento negro em 65% dos casos. A *Prevotella intermedia* foi encontrada em 45% dos casos, *Porphyromonas endodontalis* em 35%, *Porphyromonas gingivalis* em 22,5%, *Prevotella nigrescens* em 17,5% e *Prevotella tanneriae* em 5% das amostras. Dez amostras possuíam duas espécies bacterianas produtoras de pigmento negro. A *Prevotella intermedia* foi encontrada associada com *Porphyromonas endodontalis* em três casos e com a *Prevotella nigrescens* também em três casos. A *Porphyromonas*

endodontalis e a *Porphyromonas gingivalis* foram encontradas juntas em quatro casos. Quatro amostras possuíam três espécies bacterianas produtoras de pigmento negro. Duas destas amostras possuíam *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* e nas outras duas *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*. Duas amostras possuíam quatro espécies de bactérias produtoras de pigmento negro. Uma amostra possuía *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella tanneriae*, e a outra *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella tanneriae*. Pelo método convencional de cultura detectaram-se pelo menos uma espécie bacteriana das cinco espécies bacterianas produtoras de pigmento negro analisadas neste estudo, em 15% dos casos. A *Prevotella intermedia* foi encontrada em 10% dos casos e a *Porphyromonas gingivalis* em 5% dos casos. As outras espécies, *P. denticola*, *P. loescheti*, *P. melaninogenica*, foram também identificadas pelo método convencional. Duas amostras possuíam duas espécies bacterianas produtoras de pigmento negro sendo que, uma amostra possuía *Prevotella intermedia* e *P. melaninogenica* e a outra *Prevotella intermedia* e *P. loescheti* e uma amostra possuía três espécies bacterianas produtoras de pigmento negro, *P. denticola*, *Prevotella intermedia*, *P. loescheti*.

Tomazinho e Campos (2007) coletaram amostras do SCR infectados de dentes de 100 pacientes e utilizaram o método de cultura e o método molecular para identificação de *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Em 33 amostras coletadas do SCR foram detectados, utilizando método de cultura pelo menos um tipo de bactéria produtora de pigmento negro e um total de 81 microrganismos foram recuperados. Neste método 75,6% das amostras eram *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, 15,2% *Porphyromonas gingivalis* e 9,1% *Porphyromonas endodontalis*. Além

disso, observou-se uma associação da *P. intermédia* e *P. nigrescens* com *P.gingivalis* em 21,2% das amostras e da *P. intermédia* e *P. nigrescens* com *P. endodontalis* em 3% dos casos. Quando utilizaram os métodos moleculares, PCR, em 60 amostras foram detectados *P.gingivalis* (43,3%), *P. nigrescens* (43,3%), *P. intermédia* (31,7%), e *P. endodontalis* (23,3%). Adicionalmente, foi encontrado o dobro de associações bacterianas. *P. intermédia* com *P. gingivalis* (8,3%) e com *P. nigrescens* (6,7%); *P. nigrescens* com *P. gingivalis* (3,3%) e com *P. endodontalis* (3,3%); *P. gingivalis* com *P. endodontalis* (3,3%). Além disso, as associações bacterianas de três microrganismos foram em cinco amostras da seguinte forma: *P. intermédia* com *P. nigrescens* e *P. gingivalis* (5%) e *P. intermédia* com *P. nigrescens* e *P. endodontalis* (3,3%).

Siqueira *et al.* (2007) analisaram 32 dentes unirradiculares com polpa necrótica e com evidência clínica ou radiográfica de periodontite apical, com o objetivo de identificar bactérias cultiváveis pelo método molecular PCR (16S rRNA). As amostras foram coletadas destes canais e utilizaram-se os meios de cultura em anaerobiose. A diferença básica com os outros estudos foi na identificação pela seqüência de gens (16S rRNA) ao invés de procedimentos baseado no fenótipo. O número médio de espécies bacterianas encontradas nos canais foi de 3.1, variando de 2 até 8. A quantidade média de UFC foi de $4,2 \times 10^5$. Os canais radiculares com lesões periapicais maior ou igual 5 mm possuíam número maior de espécies bacterianas e maior número de UFC comparado com aquelas menores de 5 mm. As espécies bacterianas mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Micromonas micros*, *Streptococcus mitis biovar 2*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*. Os filos bacterianos identificados neste estudo foram *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* e *Proteobacteria*. O filo *Firmicutes* foi o que apresentou o maior número de representantes nas amostras examinadas, seguido pelo

filo *Actinobacteria*. Membros de outros três filios, *Synergistes*, *Spirochaetes* e *TM7*, não foram detectados no presente estudo, porque não são cultiváveis nos meios usados. Algumas espécies recentemente nomeadas também foram encontradas neste estudo, incluindo *Dialister invisus*, *Prevotella marshii* e *Prevotella salivae*, porém em baixa prevalência devido à dificuldade de crescimento e identificação com a metodologia utilizada.

No estudo de Jacinto *et al.* (2008) foram avaliados 110 canais radiculares de dentes portadores de abscesso periapical agudo ou crônico. Foram encontrados, utilizando métodos de cultura, 580 microrganismos pertencentes a 88 espécies diferentes, e no máximo nove espécies diferentes por canal; 81,4% dos microrganismos encontrados eram anaeróbios estritos sendo que 45% destes eram gram negativos. *Fusobacterium nucleatum* foi encontrado em 34,5% dos canais radiculares examinados e as espécies mais comumente associadas com ele foram *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Gemella morbillorum*, *Porphyromonas gingivalis*. *Fusobacterium necrophorum* foi isolado em 18,2% dos canais e as espécies mais comumente associadas com ele foram *Peptostreptococcus spp.*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Gemella spp.*, *Clostridium spp.* A presença simultânea de *F. nucleatum* e *F. necrophorum* foi encontrada em quatro canais dos 110 examinados.

Siqueira *et al.* (2009) analisaram a presença e a quantidade de 28 espécies bacterianas no terço apical de 20 dentes extraídos com necrose pulpar e lesão periapical, utilizando análise molecular PCR. As bactérias estavam presentes em 19 dentes. As espécies detectadas foram *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Bacteroidetes* oral clone X083, *Streptococcus* espécies, *Olsenella uli*, *Synergistes* oral clone BA121, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Dialister* oral clone B5016, *Parvimonas micra*, *Treponema dentícola*, *Filifactor alocis*. Destas bactérias, somente

Bacteroidetes clone X083 e *Synergister* clone BA121 foram encontradas em níveis acima de 10^5 UFC.

Roças e Siqueira (2009) investigaram a prevalência de três novos candidatos a patógenos orais que são a *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* e o ainda não cultivável *Bacteroidetes* clone X083 em infecções primárias, pelo método molecular PCR. Foram obtidas 52 amostras de dentes unirradiculares de adultos com lesões cariosas, polpas necróticas e evidência radiográfica de periodontite apical. Os dentes foram agrupados da seguinte forma: 21 dentes com periodontite apical crônica assintomática, 10 dentes com periodontite apical aguda sintomática e 21 casos com abscesso apical agudo. Os *Bacteroidetes* clone X083, *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* foram encontrados em 81%, 43% e 38% respectivamente dos canais radiculares associados com periodontite apical crônica. Nos dentes com periodontite apical aguda, o *Bacteroidetes* clone X083 foi encontrado em 60% e ambos *P. baroniae* e *P. multisaccharivorax* foram encontrados em 40%. Nos dentes com abscesso periapical agudo, o mais prevalente foi o *P. baroniae* sendo detectado em 24% dos casos, *Bacteroidetes* clone X083 e *P. multisaccharivorax* foram encontrados em 14% e 5% respectivamente. No total, o método molecular PCR detectou 50% de *Bacteroidetes* clone X083, 35% de *P. baroniae* e 25% de *P. multisaccharivorax* em dentes com infecção primária. Esses resultados sugerem que *Bacteroidetes* clone X083 pode ser um candidato a patógeno endodôntico e que tem sido previamente desprezado por limitações inerentes ao método de cultura. Devido ao fato deste filotipo emergir como um patógeno endodôntico potencialmente importante, esforços devem ser direcionados para sua cultura, a fim de se compreender as suas características patogênicas.

Saito *et al.* (2009) analisaram dentes de 32 pacientes portadores de infecção endodôntica primária com polpa necrótica decorrente de cárie extensa, para detectar, pelo método molecular

PCR, a presença de *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*. Os pacientes foram classificados em dois grupos: sintomáticos com dor espontânea (14), e assintomáticos (18). As *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* e a coexistência de ambas as espécies foram detectadas em 28%, 66% e 22% dos pacientes, respectivamente. *Tannerella forsythia* foi mais prevalente e mais abundante nos grupos estudados do que *Porphyromonas gingivalis*. Nenhuma diferença estatística em relação aos níveis de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ou as duas espécies integradas foi observada entre os grupos assintomáticos e sintomáticos, indicando que essas espécies não têm um papel determinante na dor de origem endodôntica.

A participação das espiroquetas nos processos de doenças perirradiculares tem sido sugerida desde 1894 por Miller. O cultivo de espiroquetas orais é muito difícil por se tratarem de espécies com exigente suprimento nutricional e condições de anaerobiose estritas para seu crescimento. Os estudos moleculares demonstram que diferentes espécies de espiroquetas podem ser patógenos endodônticos. Mais de 80% das amostras de infecções endodônticas tem apresentado pelo menos uma espécie de espiroqueta (ROÇAS *et al.*, 2003). As espiroquetas são classificadas em oito gêneros: *Borrelia*, *Brachyspira*, *Brevinema*, *Cristispira*, *Leptonema*, *Leptospera*, *Spirochaeta* e *Treponema* (LOPES e SIQUEIRA, 2004). Todas as espiroquetas orais pertencem ao gênero *Treponema* e nove espécies são comumente descritas (PASTER *et al.*, 2001).

Siqueira *et al.* (2000) utilizaram 21 dentes unirradiculares de pacientes adultos, com lesões cariosas, polpas necróticas e evidência radiográfica de perda óssea perirradicular para detectar, pelo método PCR, a ocorrência de *Treponema dentícola*. Dos 21 dentes avaliados, cinco mostraram dor à percussão, um caso com a presença de fístula, um caso de abscesso perirradicular agudo e 14 casos assintomáticos. *Treponema dentícola* foi detectada em 11 dos 21 canais infectados (52,4%), sendo que oito eram casos

assintomáticos. Nenhum sinal ou sintoma foi associado positivamente com a presença desta espécie bacteriana no SCR. A presença desta espiroqueta foi relativamente alta nas infecções endodônticas analisadas neste estudo. *Treponema denticola* é um microrganismo patogênico envolvido em doenças periodontais, mas acredita-se que possa também participar na patogênese das lesões perirradiculares de origem endodôntica.

Baumgartner *et al.* (2003) analisaram amostras endodônticas de 138 pacientes. Destes, 54 eram portadores de dentes com necrose pulpar assintomático e 84 portadores de abscesso/celulite de origem endodôntica sintomático. As espiroquetas foram detectadas, pelo método molecular PCR, em 51,45% dos casos analisados, sendo que nos casos de abscesso/celulite foram encontradas em 60,71% (51 dos 84 casos) e nos casos de necrose assintomática em 37,04% (20 dos 54 casos). *Treponema socranskii* foi a espécie mais freqüentemente detectada sendo encontrada em 44,93% dos casos, seguida do *Treponema maltophilum* (29,71%), *Treponema denticola* (28,99%), *Treponema pectinovorum* (13,77%) e *Treponema vincentii* (5,07%). *Treponemas* foram detectados de uma a cinco espécies por amostra. Associação positiva foi encontrada entre *Treponema maltophilum* e *Treponema socranskii* e entre *Treponema maltophilum* e *Treponema denticola*. Este estudo mostrou que as espiroquetas estão associadas com a infecção endodôntica.

Com o propósito de avaliar, pela primeira vez, a presença de treponemas orais recentemente nomeadas, *Treponema parvum* e *Treponema putidum* em infecções primárias, Roças e Siqueira (2005) analisaram 50 amostras endodônticas através do método molecular PCR. As amostras endodônticas foram divididas em 21 casos diagnosticados como periodontite apical crônica assintomática, 10 casos como periodontite apical aguda e 19 casos como abscesso apical agudo. Nos casos de periodontite apical aguda e crônica as amostras foram obtidas dos canais radiculares e nos casos de

abscesso as amostras foram obtidas pela aspiração de secreção purulenta da mucosa inchada. A prevalência de *Treponema parvum* em infecções primárias foi de 26% (13 dos 50 casos). *T. parvum* foi detectada em 11 dos 21 (52%) casos com periodontite apical crônica, em dois dos 10 (20%) casos com periodontite apical aguda e em nenhum caso de abscesso. *T. parvum* foi associado com casos assintomáticos. *Treponema putidum* foi encontrado em somente um caso de periodontite apical aguda (2% do número total dos casos investigados). Os achados sugerem que estas duas espécies bacterianas fazem parte da microbiota associada com diferentes tipos de doenças perirradiculares.

Para avaliar a presença de *Catonella morbi* e *Granulicatella adiacens*, que são espécies bacterianas do filo *Firmicutes*, em infecções endodônticas primárias, Siqueira e Rôças (2006) utilizaram 50 amostras coletadas de dentes unirradiculares necrosados, com evidência radiográfica de lesão periapical. As amostras foram divididas em 21 casos de periodontite apical crônica, 10 casos de periodontite apical aguda e 19 casos de abscesso apical agudo. Nos casos de periodontite apical crônica e aguda as amostras foram obtidas dos canais radiculares e nos casos de abscesso agudo foram através de aspiração de secreção purulenta da mucosa inchada. Utilizando métodos moleculares (PCR) foram detectadas 33% de *Catonella morbi* e 19% de *Granulicatella adiacens* nas amostras dos canais associados com periodontite apical crônica. *Catonella morbi* foi em 30% e *Granulicatella adiacens* 10% detectada nos casos de periodontite apical aguda e nos casos de abscesso agudo *Catonella morbi* e *Granulicatella adiacens* foram detectados em 16% e 11% respectivamente. No total das 50 amostras endodônticas com infecção endodôntica primária, *Catonella morbi* foi detectada em 13 casos (26%) e *Granulicatella adiacens* em sete casos (14%). Nenhuma das duas espécies bacterianas foi associada positivamente com sintomas clínicos. Embora exista a possibilidade de que algumas espécies bacterianas presentes em infecções endodônticas sejam

meramente circunstanciais, os achados deste estudo permitem incluir a *Catonella morbi* e *Granulicatella adiacens* na lista das bactérias endodônticas.

Roças e Siqueira (2006) investigaram a presença de *Eikenella corrodens* e *Veillonella parvula* em infecção primária usando método molecular PCR (16S rRNA) em 50 amostras de dentes unirradiculares de adultos com lesão cariosa, polpa necrótica e evidência radiográfica de lesão periapical. Dos 50 dentes, 21 eram casos assintomáticos com periodontite apical crônica, 10 com periodontite apical aguda sintomática e 19 diagnosticado como abscesso apical agudo sintomático. *Veillonella parvula* e *Eikenella corrodens* foram respectivamente detectadas em 33% e 14% dos canais associados com periodontite apical crônica. Ambas as espécies foram encontradas em 10% dos casos diagnosticados como periodontite apical aguda. Nos casos de abscesso, *Veillonella parvula* e *Eikenella corrodens* foram detectados em 21% e 26% dos casos, respectivamente. No total, foram detectados pelo método molecular PCR, 24% de *Veillonella parvula* (12 de 50 casos) e 18% de *Eikenella corrodens* (nove de 50 casos) das amostras endodônticas com infecção primária. Nenhuma das duas bactérias foi positivamente associada com sintomas clínicos. A alta prevalência das espécies bacterianas neste estudo, utilizando método molecular para detecção, comparado com estudos anteriores que utilizaram métodos de cultura, sugere que a presença destas bactérias tem sido subestimada quando se utiliza somente métodos de cultura.

2.4 Microbiota do sistema de canais radiculares com infecção persistente e secundária

Existem pressões seletivas que operam nos SCR não tratados favorecendo o estabelecimento de um grupo restrito de bactérias da microbiota oral. No entanto, condições especiais devem também existir para que os microrganismos persistam nos SCR tratados e que se reinfectaram. Isto inclui a capacidade de alguns microrganismos em resistir aos procedimentos mecânicos-químicos utilizados durante a terapia endodôntica sobrevivendo em um meio onde exista pequena disponibilidade de nutrientes. Além disso, as inter-relações com outras bactérias são mínimas. Poucas bactérias parecem ter tal capacidade (SUNDQVIST, 1992a).

A infecção intra-radicular secundária é causada por microrganismos que não estavam presentes na infecção primária e que penetraram no SCR durante o tratamento endodôntico, entre as sessões ou mesmo após a conclusão do tratamento. Se tais microrganismos forem capazes de sobreviver e colonizar o novo habitat, o canal radicular, uma infecção secundária se estabelecerá. Já a infecção intra-radicular persistente é aquela causada por microrganismos que, de alguma forma, resistiram aos procedimentos mecânicos químicos. Os microrganismos envolvidos são oriundos de uma infecção primária ou secundária. As infecções persistentes, assim como as secundárias, podem levar ao fracasso da terapia endodôntica (LOPES e SIQUEIRA, 2004).

A microbiota detectada nos SCR que já haviam recebido tratamento endodôntico prévio pode ser caracterizada como monoinfecção com predomínio de microrganismos gram positivos e com aproximadamente igual proporção de anaeróbios facultativos e obrigatórios. Esta composição difere muito daquela vista em canais infectados não tratados, na qual tipicamente tem uma microbiota com aproximadamente igual proporção de bactérias gram positivas e gram

negativas, e são dominados por anaeróbios obrigatórios (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007).

O número de espécies bacterianas isoladas de casos de retratamento endodôntico está relacionado com a qualidade do tratamento endodôntico previamente realizado. Dentes com baixa qualidade no tratamento endodôntico têm maior probabilidade de serem encontrados microrganismos similares àqueles encontrados em dentes não tratados, possuindo um grande número de espécies (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Espécies do gênero *Enterococcus* têm significativa importância na microbiologia endodôntica. Essas bactérias, que possuem resistência a agentes antimicrobianos e outros fatores de patogenicidade, se não controladas, podem ser favorecidas pela alteração nas condições ecológicas dos canais radiculares e estabelecer um processo infeccioso de difícil tratamento. Representantes desse gênero, de modo especial os *Enterococcus faecalis*, foram relacionados a casos de insucesso no tratamento endodôntico (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Os *Enterococcus faecalis* podem ser extremamente resistentes a vários medicamentos, incluindo o hidróxido de cálcio. Essa resistência está relacionada ao funcionamento de uma bomba de prótons, a qual reduz o pH intracitoplasmático por bombear prótons para dentro da célula (EVANS *et al.*, 2002).

Siren *et al.* (1997) selecionaram amostras de canais radiculares para serem analisadas microbiologicamente utilizando método de cultura. Foram formados dois grupos com 40 casos baseado nas espécies bacterianas presentes no SCR. O primeiro grupo consistia de dentes onde o *Enterococcus faecalis* e/ou outras bactérias facultativas entéricas ou *Pseudomonas sp.* foram encontradas sozinhas nas amostras ou associadas com outras espécies. O segundo grupo consistia de dentes onde não foram encontradas bactérias entéricas. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana entérica mais encontrada e em 33% dos casos

onde foi encontrada, ocorreu como monoinfecção. As outras bactérias entéricas facultativas encontradas foram *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazaki*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoga*, *Acinetobacter sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, na qual 4 de cada 10 eram monoinfecção. A maioria das outras espécies frequentemente encontradas associadas às bactérias entéricas foram *Streptococcus sp.*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia/nigrescens*. Estas bactérias foram também as mais comumente encontradas no grupo das bactérias não entéricas. Neste estudo também se observou que as bactérias entéricas eram mais freqüentes nos casos com maior número de consultas (10 consultas ou mais) e quando o canal era deixado aberto durante o tratamento ou quando havia um inadequado selamento coronário. Na maioria dos casos de retratamento foram isoladas bactérias entéricas.

No estudo de Sundqvist *et al.* (1998) 54 dentes foram selecionados para retratamento. Todos eram assintomáticos e mostraram evidência radiográfica de lesão periapical. As amostras foram colhidas na primeira consulta no momento da desobstrução, na segunda consulta sete dias após e na terceira consulta antes da reobturação. Métodos de cultura avançados foram utilizados neste estudo. Recuperaram-se bactérias de 24 dentes após a remoção da obturação. Dentre elas, estavam principalmente *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israeli*, *Bacteróides gracilis*, *Streptococcus anginosus*, *Peptostreptococcus micros*, *Cândida albicans*. Em 19 dentes uma única espécie foi encontrada, em quatro casos havia duas espécies e em um caso houve infecção polimicrobiana com quatro espécies. Em nove casos onde *Enterococcus faecalis* foi isolado, esta espécie foi encontrada em monocultura. Neste estudo, *E. faecalis* foi isolado em 38% dos dentes em que foram recuperados microrganismos, na qual sugere que ele é um importante agente no fracasso endodôntico. O índice de sucesso nos retratamentos, onde as lesões foram curadas completamente, foi de 74%. O índice de sucesso para os dentes onde foi isolado o *Enterococcus faecalis* foi

pouco menos de 66%. Nas amostras coletadas no momento da obturação, os microrganismos foram recuperados em seis canais radiculares. Quatro das lesões associadas com estes dentes não curaram. Dos dentes, onde não foram recuperados microrganismos no momento da obturação houve um índice de sucesso de 80%, comparado com 33% daqueles dentes onde os microrganismos estavam presentes no momento da obturação. O tamanho inicial das lesões periapicais, neste estudo, sugeriu influenciar no resultado do tratamento, com melhores resultados para as lesões menores.

No estudo de Sjogren *et al.* (1997) foram tratados em sessão única 55 canais de dentes com necrose pulpar e evidência radiográfica de lesão periapical. As amostras foram coletadas do SCR, para pesquisa microbiológica através de métodos avançados de cultura, antes e após o preparo mecânico químico e no momento da obturação. Antes do preparo mecânico químico todas as amostras continham bactérias e após a instrumentação 40% dos canais permaneciam infectados. Cinquenta e três dentes foram acompanhados ao longo dos anos, onde se encontrou que 44 das lesões regrediram e nove casos foram considerados fracassos. Dos casos de insucessos, sete pertenciam ao grupo onde foram encontradas bactérias após a instrumentação e no momento da obturação. O índice de sucesso nos dentes com cultura positiva após serem instrumentados e no momento da obturação foi de 68%, enquanto que entre os dentes onde não havia bactérias neste momento o índice de sucesso foi de 94%. As bactérias mais encontradas no momento da obturação foram *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium anaerobius*, *Eubacterium lentum*, *Bacteróides gracilis*, *Actinomyces israeli*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium propionicum*, *Prevotella buccae*. Os casos de insucessos submetidos à análise histológica, mostraram a presença de *Actinomyces sp.* no tecido periapical. Análises estatísticas revelaram que a ausência de bactéria no momento da obturação aumenta a probabilidade de resultado favorável e que o tamanho

inicial da lesão, nos casos tratados, aparentemente não teve nenhuma influência no resultado do tratamento. Este estudo comprovou não ser possível erradicar todas as bactérias do SCR infectados em uma única sessão, sugerindo que a obturação seja feita em outra sessão, após um período de medicação antimicrobiana.

Roças *et al.* (2004) utilizaram 80 amostras obtidas de dentes de pacientes adultos com evidência radiográfica de doença perirradicular para analisarem a presença de *Enterococcus faecalis* nos diferentes tipos de infecção endodôntica, utilizando o método molecular PCR. As amostras foram divididas nos seguintes grupos: 21 casos de dentes não tratados endodonticamente com lesão perirradicular crônica assintomática, 10 casos diagnosticado como periodontite apical aguda, 19 casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo e 30 casos de dentes já submetidos ao tratamento endodôntico há mais de dois anos, mas associados com lesão perirradicular crônica assintomática, na qual tinha sido selecionado para retratamento. O *Enterococcus faecalis* foi detectado em 33% dos casos de infecção primária com lesão perirradicular crônica assintomática, em 10% dos casos associados com periodontite apical aguda, em 5% dos casos de abscesso perirradicular agudo. No total, o *Enterococcus faecalis* estava presente em 18% dos casos de infecção endodôntica primária e estava mais associado com casos assintomáticos. Nos casos de infecção endodôntica persistente, associados aos canais radiculares já tratados, *Enterococcus faecalis* foi detectado em 67% das amostras. Em casos de fracassos endodônticos é de aproximadamente nove vezes mais provável possuir este microrganismo do que nos casos de infecção primária. Estes autores sugerem que a presença de *Enterococcus faecalis* nos casos de insucessos endodônticos possa ser resultado de uma infecção persistente, estando esta bactéria presente na infecção primária e ter

resistido ao preparo mecânico químico ou um caso de infecção secundária durante ou após a terapia endodôntica.

Gomes *et al.* (2005) analisaram 50 dentes com necrose pulpar que necessitavam de tratamento endodôntico e 50 dentes com tratamento endodôntico realizado há mais de quatro anos que mostravam evidência radiográfica de lesão periapical. As amostras foram coletadas do SCR e utilizaram o método de cultura e o método molecular (PCR) para investigar a presença de quatro espécies bacteriana BPPN: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*. As bactérias BPPN foram recuperadas em 13% dos canais radiculares quando se utilizou o método de cultura e em 50% dos canais pelo o método molecular. O método de cultura detectou estas espécies bacterianas em 22% das amostras de infecção primária e em 4% das amostras com infecção secundária, enquanto que o método PCR detectou 64% destas espécies bacterianas em infecção primária e 36% em infecção secundária. Pelo método de PCR a *Porphyromonas gingivalis* foi a espécie mais predominante nas amostras (38%) seguido pela *Prevotella intermedia* (33%), *Porphyromonas endodontalis* (25%) e *Prevotella nigrescens* (22%). A *Porphyromonas gingivalis* foi raramente isolada pelo método de cultura (1%) e a *Porphyromonas endodontalis* não foi recuperada por esse método em nenhuma amostra. Seis amostras obtiveram as mesmas espécies bacterianas usando-se o método molecular e o método de cultura. Quarenta e quatro amostras revelaram espécies bacterianas somente pelo método PCR e sete amostras detectaram *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* pelo método de cultura, mas não no método molecular. Esta discrepância entre os achados do método de cultura e PCR pode ser devida há um possível erro de identificação causado pelo kit comercial usado para identificação microbiológica no método de cultura. As bactérias anaeróbias produtoras de pigmento negro detectadas pelo método de cultura podem pertencer a outras espécies tais como a recente nomeada *Prevotella tanneriae*,

patógeno comumente encontrado em infecções endodônticas. Pela identificação PCR, uma ou mais espécies bacterianas produtoras de pigmento negro foram detectadas em 65,8% dos dentes com dor a palpação, em 76,7% dos dentes com edema e em 71,4% dos dentes com exsudato purulento. Nos casos de retratamento, estas espécies produtoras de pigmento negro foram encontradas nos dois casos onde havia sintomatologia aguda, dor a palpação e exsudato purulento, e em seis casos dos 15 onde havia dor a percussão. Estas espécies bacterianas também foram encontradas em 28,5% dos casos assintomáticas. Neste estudo, o método molecular PCR foi capaz de identificar mais espécies bacterianas produtoras de pigmento negro do que o método de cultura.

Gomes *et al.* (2006 a) investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecção primária e em infecção secundária. Utilizaram 50 dentes em cada grupo e os métodos de detecção bacteriana foram análise molecular (PCR) e meios de cultura. Pelos meios de cultura, os *Enterococcus faecalis* foram identificado em 23 dentes dos 100 analisados e pelo método molecular em 79 dentes. Utilizando o método de cultura o *Enterococcus faecalis* foi detectado em 2 (4%) dos 50 dentes com infecção primária e em 21 (42%) dos 50 dentes com infecção secundária. Na infecção primária o *E. faecalis* estava presente em uma microbiota mista e na infecção secundária, na maioria dos casos, em monocultura. Pelo método de PCR o *E. faecalis* foi detectado em 41 (82%) dos 50 dentes com infecção primária e 38 (76%) dos 50 dentes com infecção secundária. A alta prevalência de *E. faecalis* na infecção primária, neste estudo, pode estar associado ao fato de que a maioria destes dentes possuíam infiltração coronária (presença de cáries ou restauração defeituosa), enquanto que nos casos de retratamento foi observado menor número de dentes com infiltração coronária.

No estudo de Gomes *et al.* (2006 b) 100 pacientes precisavam de tratamento endodôntico, sendo que 50 eram infecção

primária e continham polpa necrótica e 50 eram infecção secundária, na qual havia sido realizado tratamento endodôntico prévio mas enquadrava-se como insucesso baseado em sinais e sintomas clínicos e radiográficos. As amostras coletadas do SCR foram submetidas à análise molecular PCR para investigar a presença de anaeróbios estritos como *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Foi possível detectar *Filifactor alocis* de 23 canais (46%) com infecção primária e de 12 (24%) canais com infecção secundária. *Tannerella forsythia* foi detectada em 12 (24%) dos canais com infecção primária e 3 (6%) com infecção secundária, *Treponema denticola* em 19 (38%) canais com infecção primária e 12 (24%) canais com infecção secundária. Encontrou-se significativa associação entre infecção primária e a presença de *F. alocis* e *T. denticola*. O baixo número de *T. forsythia* encontrado em retratamento pode ser um indicativo que essa bactéria não exerce um papel importante nos fracassos do tratamento endodôntico.

Sedgley *et al.* (2006) selecionaram dentes com suspeita de infecção intracanal baseado na presença de fístula, lesão periapical radiográfica persistente ou presença de sintomas e em condições de receberem isolamento absoluto. O material experimental compreendia amostras de 40 canais radiculares em tratamento endodôntico com infecção primária e 48 submetidos ao retratamento. As 88 amostras foram avaliadas para detecção e quantificação de *Enterococcus faecalis* tanto pela técnica de cultura quanto pelo método molecular qPCR (Real-time quantitative PCR). As bactérias foram detectadas, pelo método de cultura em 48 das 88 amostras, e pelo método de qPCR em todas as 88 amostras. O *Enterococcus faecalis* foi recuperado de nove das 88 amostras (10,2%) pelo método de cultura comparado com 70 das 88 amostras (79,5%) utilizando o qPCR e estava presente em 89% dos casos de retratamento e em 67,5% das infecções primárias. Em relação a quantificação, não houve diferença estatística significante no número total de bactérias na infecção primária e no grupo do retratamento. A

proporção de *Enterococcus faecalis* em relação ao total de bactérias por canal radicular foi maior na infecção primária comparada com os casos de retratamento.

Blome *et al.* (2008) analisaram 40 dentes com evidência radiográfica de periodontite apical crônica. Os dentes foram divididos em dois grupos de 20 dentes. Um grupo apresentava infecção primária com dentes portadores de periodontite apical crônica assintomática e outro grupo de dentes com periodontite apical crônica assintomática que necessitavam de retratamento endodôntico. As amostras, para análise microbiológica pelo método molecular PCR, foram colhidas em três momentos; a primeira após a abertura pulpar e estabelecimento do comprimento do canal radicular, a segunda logo após o preparo mecânico-químico e a terceira amostra obtida após um período de 14 dias, durante o qual o canal ficou preenchido com hidróxido de cálcio. Os canais radiculares com infecção primária possuíam maior número de bactérias e maior diversidade de espécies bacterianas do que os canais com infecção secundária. Em ambos os grupos, a quantidade e a frequência de bactérias foram significativamente reduzidos após preparo mecânico-químico dos canais radiculares. A utilização de hidróxido de cálcio como medicamento intracanal por 14 dias, não levou a uma redução adicional na contagem bacteriana, embora tenha reduzido a frequência de espécies bacterianas. A redução na quantidade de bactérias detectáveis no grupo de infecção primária foi de 99,9% e na infecção secundária foi de 97,3%. *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas endodontalis* foram as espécies bacterianas mais frequentes em ambos os grupos (55% e 35% respectivamente), seguido de *Tanerella forsythia* (30%), *Fusobacterium nucleatum* (27,5%), *Treponema denticola* (22,5%), *Porphyromonas gingivalis* (12,5%), *Prevotella intermédia* (5%), *Enterococcus faecalis* (12,5%). *A. actinomycetemcomitans* não foi detectado em nenhuma amostra. *P. micros* estava positivamente associado com *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. forsythia*. *T. forsythia* e *T. denticola*, *T.*

forsythia e *F. nucleatum* também estavam positivamente associados. Além disso, significativa associação também foi encontrada entre *P. endodontalis* e *P. gingivalis* e entre *P. endodontalis* e *F. nucleatum*. As espécies bacterianas pertencentes ao complexo vermelho, que são *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, foram simultaneamente encontrada em 5% dos casos. Pelo menos uma espécie bacteriana deste complexo foi detectada em 40% dos casos, sugerindo alta associação das bactérias do complexo vermelho com a infecção endodôntica. *Enterococcus faecalis* foi encontrado em 10% dos casos que necessitavam de retratamento e *Peptostreptococcus micros* foi encontrado em 45% destes casos. Este estudo sugere que a infecção secundária não é uma infecção específica com *Enterococcus faecalis*, mas com etiologia bacteriana complexa.

Estudos utilizando método de cultura demonstraram que a microbiota de dentes com insucesso no tratamento endodôntico com lesões periapicais consistiam principalmente de uma ou duas espécies que eram predominantemente gram positivas, sendo o *Enterococcus faecalis* a espécie mais prevalente (SUNDQVIST, 1998). Com o propósito de determinar a diversidade bacteriana associada com dentes com infecção secundária ou persistente, Sakamoto *et al.* (2008) utilizaram método molecular PCR (16S rRNA) em nove dentes com indicação de retratamento endodôntico, assintomáticos e com periodontite apical. Em todos os casos foram detectadas espécies bacterianas. Setenta e quatro espécies foram identificadas sendo que 41 delas eram cultiváveis e 25 eram novas espécies ainda não conhecidas. Seis filos bacterianos foram representados neste estudo predominando o filo *Firmicutes* (39%) seguido do filo *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Synergistes*. Uma média de 10 espécies bacterianas foi detectada por canal retratado, variando de uma a 26 espécies. Somente 11 espécies foram encontradas em mais de um caso. São elas: *Bacteroidetes oral clone X083*, *Saprosiraceae bactéria clone BR03BG08*, *Prevotella oris*, *Prevotella baroniae*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Streptococcus mutans*, *Synergistes* espécie oral clone BA121, *Dialister* espécie oral clone 9N-1, *Enterococcus faecalis*, *Flavobactéria genomsp.C1* e *Peptostreptococcus* espécie oral clone FG014. Uma alta variabilidade interindividual na composição da microbiota foi evidente. As espécies mais dominantes também variaram entre as amostras sendo que em cada amostra foi encontrado o predomínio de uma das seguintes espécies: *Bacteroidetes* oral clone X083, *Synergistes* espécie oral clone BA121, *Flavobacteriaceae genomsp C1*, *Saprospiraceae* clone BR031BG08, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Corynebacterium durum*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Prevotella nigrescens*. O *Enterococcus faecalis* foi encontrado em somente dois casos dos nove casos estudados e não foi a espécie dominante, sugerindo que esta espécie esteja presente em uma policultura e não em monocultura como é relatado nos estudos que utilizam o método de cultura. Logo, neste estudo, ficou comprovado que o método molecular PCR revela uma maior diversidade de espécies bacterianas em canais com infecção secundária ou persistente.

No estudo de Schirrmeister *et al.* (2009) 20 dentes assintomáticos que haviam sido tratados endodonticamente há mais de quatro anos, foram retratados em decorrência de lesão periapical evidenciada radiograficamente. Em todos os casos, a obturação encontrava-se até quatro milímetros aquém do ápice radiográfico e sem exposição direta à cavidade oral. As amostras coletadas dos SCR foram analisadas através de cultura para análise morfológica e bioquímica e identificação através da seqüência de gene pelo 16S rRNA (método PCR). Em 50% dos casos selecionados, houve recuperação de microrganismos. A quantidade recuperada foi em média $3,5 \times 10^3$ UFC/mL para aeróbios e de $5,5 \times 10^5$ UFC/ml para anaeróbios. A grande quantidade de bactérias viáveis neste estudo pode ter sido causada por uma alta porcentagem de canais obturados aquém do ápice (50%) e com obturação pobre em densidade (55%). Nestes canais, a microbiota na porção apical do canal pode ser

similar àquela da infecção primária, onde alta quantidade de UFC era encontrada comparada com infecção secundária. *Vagococcus fluvialis* foi detectado em canais radiculares pela primeira vez. *Solobacterium moorei* e *F. nucleatum* foram as espécies mais prevalentes. Além dessas, espécies de *Actinomyces*, *Atopobium*, *Campylobacter*, *Dialister*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Megasphaera*, *Olsenella*, *Parvimonas*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Slackia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Synergister*, *Tannerella*, *Veillonella*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* foram detectados. Pela primeira vez, *Olsenella uli*, *Slackia exígua*, *Megasphaera spp.* foram detectadas em infecção secundária. A maioria das amostras revelaram uma cultura mista de 2 a 8 espécies. *Enterococcus faecalis* foi a única espécie detectada em dois pacientes, sugerindo o seu papel importante na infecção endodôntica. A presença de *F. nucleatum* foi associada com a presença de *Solobacterium moorei* em 5 de 7 casos. Em todos os dentes com *Parvimonas micra* e *Dialister invisus* foram detectados *Fusobacterium nucleatum* e *Solobacterium moorei*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A microbiota endodôntica é de natureza polimicrobiana com o predomínio de anaeróbios estritos, e aproximadamente igual proporção de espécies gram negativas e positivas;
- A microbiota endodôntica presente em dentes onde a terapia endodôntica fracassou, infecção persistente ou secundária possui menor diversidade de espécies que a infecção primária, e aproximadamente igual proporção de anaeróbios facultativos e obrigatórios;
- As espécies mais comumente isoladas nas infecções endodônticas pertencem aos gêneros: *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Campylobacter*, *Selemonas*, *Treponema*, *Tannerella*, *Actinomyces* e *Enterococcus*. O gênero *Enterococcus* foi isolado principalmente nos casos de infecção secundária ou persistente;
- A utilização de métodos moleculares (PCR) permite a identificação de microrganismos jamais detectados em canais radiculares pelo método de cultura. Alguns exemplos são *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Treponema maltophilum*, *Treponema vincentii*, *Treponema parvum*, *Treponema putidum*, *Prevotella tanneriae*, *Dialister*, *Solobacterium*, *Olsenella*, *Megasphaera*.
- Uma melhor compreensão do papel das diferentes espécies microbianas nas infecções endodônticas, poderá nos

levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e antimicrobianas para o sucesso da terapia endodôntica.

4 REFERÊNCIAS

AAS, J. A. *et al.* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, Nov. 2005.

BAUMGARTNER, J. C. *et al.* Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 29, n. 12, p. 794-797, Dec. 2003.

BAUMGARTNER, J. C. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endodontic topics*, v.7, n.1, p. 35-51, Mar. 2004.

BLOME, B. *et al.* Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 23, n. 5, p. 384-390, Oct. 2008.

DE DEUS, Q. D. *Endodontia*. 5^o ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 695 p.

ESTRELA, C. *Ciência Endodôntica*. São Paulo: Artes Médicas, 2004. 1010p.

EVANS, M. *et al.* Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, v. 35, n.3, p. 221-228, Mar. 2002.

FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S. E. & MÖLLER, A. J. R. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scandinavian Journal Dental Research*, v. 90, n. 2, p. 134–144, April 1982 a.

FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S. E. & MÖLLER, A. J. R. Influence of combination of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal Dental Research*, v. 90, n. 3, p. 200–206, June 1982 b.

FIGDOR, D.; SUNDQVIST, G. A big role for the very small- understanding the endodontic microbial flora. *Australian Dental Journal Supplement*, v. 52, p. 38-51, Mar. 2007. Suppl.

GOMES, B. P. F. A. *et al.* *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 20, n. 4, p. 211-215, Aug. 2005.

GOMES, B. P. F. A. *et al.* *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, v. 102, n. 2, p. 247-253, Aug. 2006 a.

GOMES, B. P. F. A. *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 10, p. 937-940, Oct. 2006 b.

JACINTO, R. C. *et al.* Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 12, p. 1451-1456, Dec. 2008.

KAKEHASHI, S. *et al.* The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, v. 20, n. 3, p. 340-349, Sep. 1965.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. *Endodontia: biologia e técnica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 964p.

MUNSON, M. A. *et al.* Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *Journal of Dental Research*, v. 81, n. 11, p. 761-766, Nov. 2002.

PASTER, B. J. *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 12, p. 3770-3783, June 2001.

ROÇAS, I. N. *et al.* Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *International Endodontic Journal*, v. 36, n. 1, p. 20-26, Jan. 2003.

ROÇAS, I. N. *et al.* Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics*, v. 30, n. 5, p. 315-320, May 2004.

ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR, J. F. Occurrence of two newly named oral treponemes- *Treponema parvum* and *Treponema putidum*- in primary endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 20, n. 6, p. 372-375, Dec. 2005.

ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR, J. F. Culture-independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 6, p. 509-512, June 2006.

ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR, J. F. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone XO83 in primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 10, p. 1359-1362, Oct. 2009.

SAITO, D. *et al.* Real-time polymerase chain reaction quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 11, p. 1518-1524, Nov. 2009.

SAKAMOTO, M. *et al.* Molecular analysis of the root canal microbiota associate with endodontic treatment failures. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 23, n. 4, p. 275-281, Aug. 2008.

SCHIRRMESTER, J. F. *et al.* New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 2, p. 169-174, Feb. 2009.

SEDGLEY, C. *et al.* Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 3, p. 173-177, Mar. 2006.

SEOL, J. H. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 2, p. 110-114, Feb. 2006.

SIREN, E. K. *et al.* Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*, v. 30, n. 2, p. 91-95, Mar. 1997.

SIQUEIRA JR, J. F. *et al.* Pathogenicity of facultative and obligate anaerobic bacteria in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 13, n. 6, p. 368-372, Dec. 1998.

SIQUEIRA JR, J. F. *et al.* Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 15, n. 5, p. 335-337, Oct. 2000.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS I.N. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, v. 102, n. 2, p. 259-264, Aug. 2006.

SIQUEIRA JR, J. F. *et al.* Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 22, n. 4, p. 266-271, Aug. 2007.

SIQUEIRA JR, J. F. *et al.* Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral, Radiology and Endodontics*, v. 107, n. 5, p. 721-726, May 2009.

SJOGREN, U. *et al.* Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, v. 30, n. 5, p. 297-306, Sep. 1997.

SUNDQVIST, G. *Bacteriological studies of necrotic pulps*. 1976. 94 p. Dissertação - University Odontol, Umea, 1976.

SUNDQVIST, G. *et al.* Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *Journal of Endodontics*, v. 15, n. 1, p. 13-19, Jan. 1989.

SUNDQVIST, G. Association between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 7, n. 5, p. 257- 262, Oct. 1992 a.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. *Journal of Endodontics*, v. 18, n. 9, p. 427-430, Sep. 1992 b.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecologic, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, v. 78, n. 4, p. 522-530, Oct. 1994.

SUNDQVIST, G. *et al.* Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998.

TOMAZINHO, L. F.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, v. 103, n. 2, p. 285-288, Feb. 2007.

UMEMOTO, T. Anaerobic bacteria in odontogenic infections. *Bulletin of Kanagawa Dental College*, v.23, n.2, p.105-109, Sep. 1995.

XIA, T. *et al.* Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 15, n. 4, p. 273-275, Aug. 2000.