

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**REBECCA BASTOS ROCHA ARAÚJO SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE DENTES DECÍDUOS  
NECROSADOS UTILIZANDO A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA**

**FORTALEZA**

**2014**

REBECCA BASTOS ROCHA ARAÚJO SOUSA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE DENTES DECÍDUOS  
NECROSADOS UTILIZANDO A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. José Jeová Siebra Moreira Neto

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

A691a Araújo, Rebecca Bastos Rocha.  
Avaliação da microbiota de dentes decíduos necrosados utilizando o PCR/ Rebecca Bastos Rocha Araújo. – 2013.  
71 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. José Jeová Siebra Moreira Neto.

1. Microbiota. 2. Dentes decíduos. 3. Pulpectomia. I. Avaliação da microbiota de dentes decíduos necrosados utilizando a reação em cadeia da polimerase.

CDD ?????

---

REBECCA BASTOS ROCHA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE DENTES DECÍDUOS  
NECROSADOS UTILIZANDO A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

---

---

---

---

Dedico esta Tese:

A meus pais, Augusto e Vera, que me estimulam e apoiam nas minhas empreitadas estudantis acreditando e confiando sempre no meu trabalho,

Às minhas irmãs pelo estímulo e compreensão de sempre,

Ao Rodrigo, que sempre me apoia a cada novo desafio, estando ao meu lado,

Ao meu filho, Rodrigo, que me cedeu preciosas horas de seus primeiros anos para que este trabalho fosse concluído.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tamanha oportunidade e por estar presente no milagre diário do meu dia a dia.

Agradeço de todo coração ao Dr. Jeová, que é, sempre, um exemplo de profissional e pessoa, com o qual não aprendi somente Odontologia, mas também uma filosofia de vida.

Agradeço, de forma mais que especial, a minha Fada Madrinha, a Profa. Brenda, que com seus artigos, me fez sonhar e, com sua generosidade e espírito pesquisador, tornou realidade o sonho de um trabalho rico e original.

Agradeço à Dra. Lidiany Rodrigues e ao Dr. Sérgio Santiago, que à frente da PPGO, sempre atenderam às minhas solicitações e colaboraram para que este projeto fosse concluído.

Agradeço, com o coração cheio de saudades, a minha amiga Denise Lins de Sousa, que sonhou comigo, fez crescer esse sonho, trabalhou comigo; porque sem sua companhia, sem seu estímulo, seu apoio e seu trabalho incansável eu não teria chegado até aqui.

Agradeço, as minhas colegas Raquel Campelo, Mirela Sousa, Adriana Santiago, Cintia, Emanuele Albuquerque, Fabíola Nogueira e Walderez de Araújo, que estiveram sempre me apoiando e estimulando nos dias mais difíceis.

Agradeço aos meus colegas de Doutorado Bruno, Cláudio Fernandes, Mary Anne Melo, Juliana Paiva, Vanara Flores, que me deram a oportunidade de conhecer outras áreas clínicas na odontologia e a desenvolver trabalhos desafiadores.

Aos meus colegas de Piracicaba, em especial, Thais Mageste e Daniel Herrera, que me auxiliaram nos dias mais difíceis e tornaram fáceis os dias de aprendizado.

Agradeço aos colegas do CENTAU, que são inspiração e motivação para uma vida acadêmica.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, pela oportunidade e qualidade de todos esses anos de pós-graduação, sem o estímulo de todos os componentes dessa grande equipe, nenhuma pesquisa seria tão importante.

Agradeço a Lúcia, que, como secretária, sempre resolve e facilita a minha vida.

Agradeço a Martinha, que foi uma grande mão amiga e resolutiva na caminhada clínica deste trabalho.

Por fim, agradeço aos pacientes, que tão generosamente participaram da pesquisa e fizeram seu esforço para cumprir os retornos sem eles, nada teria sido possível.



## RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar a microbiota de dentes decíduos necrosados através da técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR), considerando as infecções endodônticas primárias de dentes decíduos, comparando a microbiota dos necrosados por cárie e traumatismos dentários. Este trabalho também avaliou a viabilidade bacteriana em três meios de transporte (Fluido Reduzido para Transporte, Tris- EDTA e *Viability Medium Göteborg Anaerobically* III), simulando as condições de transporte da microbiota endodôntica da clínica ao laboratório, considerando o tempo decorrido entre a coleta e o processamento. Participaram deste estudo clínico 43 crianças, de dois a nove anos de idade, que buscaram atendimento na Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Ceará por apresentarem necrose em dentes decíduos. Foram incluídos 47 canais necrosados de pacientes normossistêmicos com no mínimo de dois terços de raiz, possíveis de serem restaurados. Foram excluídos pacientes que estavam fazendo uso de antibiótico terapia ou aqueles que o fizeram nos últimos três meses, previamente ao início da pesquisa, e os que apresentavam comportamento inadequado para a realização da pesquisa. Para a coleta microbiológica, após a anestesia infiltrativa e isolamento absoluto, foi realizada a desinfecção do campo operatório para abertura da cavidade coronária. A coleta foi feita a partir da introdução de três cones de papel absorvente no canal mais amplo, por um minuto cada um. O armazenamento e transporte, destes microrganismos coletados, foram realizados utilizando o VMGA III, selecionado a partir de um experimento laboratorial. Neste experimento avaliou-se a viabilidade de uma cepa de *Porphiromonas gingivalis*, armazenadas em Fluido Reduzido para transporte (RTF), TE e *Viability Medium Göteborg Anaerobically*, VMGA III. Em um laboratório, sob condições de anaerobiose, foram inoculados em eppendorffs® por períodos de uma hora, duas e quatro horas. Em seguida, inoculadas em placas de Petri nestes diferentes tempos, com Fastidious Anaerobe Agar (FAA), enriquecidas. Passada 72 horas foi realizada a contagem das colônias bacterianas. Esta avaliação demonstrou que o VMGAIII foi o meio de transporte que permitiu um armazenamento superior a quatro horas, das *Porphiromonas gingivalis* para processamento em cultura, quando comparado com o RTF e o TE. Assim, as coletas microbiológicas foram introduzidas em eppendorffs® com VMGA III para posterior processamento das amostras. Das amostras foram extraídos o DNA bacteriano para posterior realização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da eletrofores, através da qual se identificaram a presença das seguintes bactérias: *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimona micra*, *Porphiromonas endodontalis*, *Porphiromonas gingivalis*, *Dislister pneumonsites*, *Filifactor alocis*, *Treponema denticola*, *Tanerella forsythia*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces naeslundii* e o *Enterococcus faecalis*. Foi então identificada uma microbiota composta de microrganismos, predominantemente, anaeróbios negativos ao teste de Gram. Os mais frequentes foram: *Prevotella nigrescens* (17,92%), *Parvimona micra* (16,24%) e *Actinomyces naeslundii* (12,88%). O menos frequentes foram: *Filifactor alocis* (1,12%), *Streptococcus mitis* (1,12%), *Enterococcus faecalis* (0,56%) e *Streptococcus mutans* (0,56%). Considerando a causa da necrose pulpar, a cárie associou-se à *Parvimona micra* ( $p=0,036$ ) e, ao trauma, o *Streptococcus mitis* (0,022). Desta forma conclui-se, a partir de coletas clínicas de dentes decíduos necrosados, que a metodologia envolvida no processo de coleta e armazenamento bacteriano, como o meio de transporte, pode influenciar em nossos achados. A amostra teve uma maior frequência de bactérias

anaeróbias, negativas ao teste de Gram. A causa da necrose pode influenciar na constituição da microbiota, onde a cárie associa-se a bactérias anaeróbias positivas e negativas ao teste de Gram, como *Parvimonas micra* e *Treponema denticola*, e associam-se ao trauma as bactérias facultativas e positivas ao teste de Gram, como a *Tanarella forsythia*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*.

**Palavras-chave:** microbiota; endodontia; transporte biológico; PCR.

## ABSTRACT

This study aims to evaluate the microbiota of necrotic primary teeth through the technique of polymerase chain reaction (PCR), whereas primary endodontic infections, comparing the microbiota of necrotic caries and dental trauma. This study also evaluated the bacterial viability in three transport medias (Reduced to Fluid Transport , Tris - EDTA and Viability Medium Göteborg anaerobically III), simulating the conditions of carriage of the endodontic microbiota from the clinic to the laboratory, considering the time elapsed between the collection and processing. This clinical study involved 43 children from two to nine years of age, who sought care at the Pediatric Dentistry Clinic of Federal University of Ceará. They might present necrosis in primary teeth. Healthy patients formed a sample with 47 necrotic channels. Were included teeth with at least two-thirds of root and able to be restored. Patients who were making use of antibiotic therapy or those who did the last three months before the start of the study, and those with inappropriate behavior for the research were excluded. For microbiological collection after infiltration anesthesia and absolute isolation, disinfection of the operative field to open the coronary cavity was performed. The collection was made from the introduction of three absorbent paper cones in the wider channel for one minute each. The storage and transport of these listed microorganisms were performed using the VMGA III selected from a laboratory experiment. In this experiment we evaluated the feasibility of a strain of *Porphyromonas gingivalis* , stored in fluid Reduced to transport (RTF), TE and Viability Medium Göteborg anaerobically, VMGA III. In a laboratory under anaerobic conditions, were inoculated in eppendorffs® for periods of one hour, two and four hours. Then inoculated in Petri dishes in these different times, with Fastidious Anaerobe Agar (FAA) enriched. Last 72 hours counting of bacterial colonies was performed. This evaluation showed that the VMGAIII was the means of transportation that allowed an upper storage to four hours of processing *Porphyromonas gingivalis* in culture when compared with the RTF and the TE. Thus, microbiological samples were introduced in eppendorffs® with VMGA III for further processing of the samples. DNA of bacterial samples for subsequent implementation of the technique of polymerase chain reaction (PCR) followed by eletrofores, through which was extracted identified the presence of the following bacteria: *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimona microns*, *Porphyromonas endodontalis*,

*Porphyromonas gingivalis*, *Dislistera pneumonites*, *alocis Filifactor*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces naeslundii* and *Enterococcus faecalis*. Then identify a microbial organisms comprising predominantly anaerobic Gram negative for the test. The most common were: *Prevotella nigrescens* (17.92%), *Parvimonas micra* (16.24%) and *Actinomyces naeslundii* (12.88 %). The less frequent were *Filifactor alocis* (1.12 %), *Streptococcus mitis* (1.12%), *Enterococcus faecalis* (0.56 %) and *Streptococcus mutans* (0.56 %). Whereas the cause of pulp necrosis, caries was associated with *Parvimonas micra* ( $p = 0.036$ ), and trauma, *Streptococcus mitis* (0.022). Thus it is concluded from clinical samples of necrotic primary teeth, the methodology involved in the bacterial collection and storage process as the means of transport, can influence our findings. The sample had a higher frequency of the Gram negative anaerobic bacteria test. The cause of necrosis may influence the establishment of the microbiota, where the decay is associated with positive and negative anaerobic bacteria to the Gram test, as *Parvimonas micra* and *Treponema denticola*, and were associated with the trauma and positive facultative bacteria to the Gram test such as *forseythia Tanarella*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis*.

**Keywords:** microbiota; endodontic; biological transport, PCR

## ABREVIATURAS

MOs - Microrganismos

TE – Tris-EDTA

RTF – Fluido Reduzido para Transporte

VMGAIII - Viability Medium Göteborg Anaerobically

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

FFOE – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CB – Coleta Bacteriana

FN - *Fusobacterium nucleatum*

PM - *Parvimonas micra*

PC - *Porphyromonas endodontalis*

PG - *Porphyromonas gingivalis*

DP - *Dislister pneumonsites*

FA - *Filifactor alocis*

TD - *Treponema denticola*

TF - *Tanarella forsythia*

EF - *Enterococcus faecalis*

SMI - *Streptococcus mitis*

SSA- *Streptococcus sanguis*

SMU - *Streptococcus mutans*

PN - *Prevotella nigrescens*

AN - *Actinomyces naeslundii*

EF – *Enterococcus faecalis*

CAPES – Cordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

BPN – Bacilos do Pigmento Negro

FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

FAA - Ágar Fastidioso para Anaeróbio

FAB - Caldo Fastidioso para Anaeróbio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## Sumário

Introdução .....	15
Proposição .....	18
Capítulos .....	18
Capítulo 1 .....	20
Avaliação de meios de transporte na manutenção da viabilidade bacteriana ..	20
Capítulo 2 .....	28
Identificação da microbiota das infecções endodônticas em dentes decíduos.	28
Discussão .....	43
Conclusão .....	46
Referências .....	46
Apêndice A .....	47
Apêndice B .....	58
Apêndice C .....	58
Apêndice D .....	66
Apêndice E .....	67
Anexo A .....	70

## INTRODUÇÃO

Os dentes decíduos são importantes para o desenvolvimento infantil. Eles favorecem a fala, da mastigação e, assim, das estruturas orofaciais. Todavia, esses dentes sofrem injúrias desde o nascimento - injúrias físicas, traumatismos dentários e injúrias biológicas; esta última, por um desequilíbrio do meio bucal, pode ocasionar doenças como a cárie. São desafios como estes que muitas vezes podem levar à necrose dos tecidos pulpares e desta forma, causar as infecções endodônticas.<sup>1-3</sup>

A manutenção dos elementos dentários injuriados na cavidade bucal por um período maior desperta interesse na microbiota endodôntica. As infecções endodônticas envolvem bactérias do tipo: aeróbias, anaeróbias e facultativas, além de positivas ou negativas ao teste de Gram.<sup>4-19</sup> Conhecer essa microbiota é importante porque, assim, pode-se estabelecer terapias com medicações eficientes para a manutenção dos dentes até o período de esfoliação fisiológica.<sup>20-23</sup>

As infecções endodônticas são diferentes quanto aos seus sintomas clínicos e sugere-se que a associação de microrganismos pode ser a causa da variação na sintomatologia.<sup>14,15,19</sup> Outro fator que se deve considerar é se os elementos são permanentes ou decíduos.<sup>11</sup> Na busca de descrever um perfil epidemiológico dessa microbiota, vários estudos vêm sendo realizados. A descrição da microbiota de canais dos dentes permanentes é amplamente investigada.<sup>4,5,8-15, 17</sup> No entanto, a de dentes decíduos tem muitas lacunas a serem preenchidas.<sup>7,18,20,23.</sup>

A busca dessa microbiota estimulou a comunidade científica a utilizar novas técnicas. Assim, a Biologia Molecular tornou possível a identificação dos microrganismos (MOs). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através da amplificação de parte do DNA bacteriano, aumentando-o a níveis possíveis de serem detectados, permitiu uma identificação das espécies bacterianas. A técnica de PCR (APÊNDICE C) não leva em consideração a viabilidade dos microrganismos o que permitiu a identificação de

microrganismos diferentes da descrita através da cultura.<sup>5</sup> Além disso, a PCR consegue identificar até pequenas quantidades de DNA bacteriano.<sup>6,14</sup> Assim, passou a ser uma das técnicas escolhidas para identificar a microbiota de amostras clínicas, como as dos canais radiculares.<sup>4-6,9-12</sup>

A busca por um meio que permitisse o armazenamento adequado, principalmente de MOs anaeróbios, era um dos desafios. O meio de transporte ideal deve apresentar condições de replicação das bactérias sem permitir o crescimento bacteriano.<sup>24</sup> O tempo de coleta para inoculação também deveria ser prolongado para viabilizar os procedimentos clínicos e os laboratoriais que permeiam o processo.<sup>25</sup> Os meios de transporte mais utilizados para bactérias da microbiota oral são: Tris-EDTA (TE), Fluido Reduzido de Transporte (RTF) e o *Viability Medium Göteborg Anaerobically* (VMGAIII) (APÊNDICE A). Dentre estes, busca-se o meio que permita a viabilidade bacteriana por um período de tempo maior até a inoculação.<sup>24</sup>

A avaliação da microbiota em canais radiculares utilizando a PCR identificou, na dentição permanente, uma predominância de microrganismos anaeróbios e negativos ao teste de Gram, sendo frequente a presença de bacilos do pigmento negro, como *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola*.<sup>6,12,19</sup> Também são encontradas as *Fusobacterium*<sup>19</sup> e a *Enterococcus faecalis*<sup>17,19</sup>. Acredita-se na diferenciação desses MOs quando em dentes decíduos, pois, consideram-se diferentes os hábitos de higiene e alimentação de crianças e adultos e também a sua colonização bacteriana na cavidade bucal. Assim, os microrganismos selecionados para este estudo foram os de maior frequência em dentes permanentes, de acordo com a literatura.<sup>4,6-20</sup> Todavia, existe uma grande variação na frequência destes microrganismos, pois, em sua maioria, a análise é de poucos grupos de espécies bacterianas.<sup>11,16</sup>

Conhecer as infecções endodônticas primárias em dentes decíduos para avaliar as terapias e medicações utilizadas é fundamental para um melhor prognóstico para esses dentes. Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar espécies bacterianas, frequentes na microbiota de dentes

permanentes, avaliando a presença destas no interior dos canais de dentes decíduos necrosados. Bem como, a realização da avaliação de três meios de transporte bacteriano.

## PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é identificar espécies bacterianas de infecções endodônticas primárias de dentes decíduos necrosados utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proposição capítulo 1  
Avalia três meios de transporte, TE, RTF e VMAGAI, quanto à viabilidade bacteriana, em cultura, considerando tempo decorrido entre coleta e processamento da *Porphyromonas gingivalis*.
- Proposição capítulo 2  
Avaliar por meio da PCR se existe diferença entre a microbiota de dentes decíduos necrosados por cárie ou por trauma.

## CAPÍTULOS

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato. Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou partes deles, os projetos de pesquisas destes trabalhos foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovados (Anexos A). Assim sendo, esta tese é composta de dois capítulos contendo artigos submetidos para publicação em revistas científicas ou em fase de redação, conforme descrito abaixo:

### Capítulo 1

Avaliação de Meios de Transporte na manutenção da viabilidade bacteriana. Sousa RBRA, Sousa DL, Duque TM, Moreira Neto JJS, Gomes BPFA. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada.

### Capítulo 2

Identificação de bactérias relacionadas às infecções endodônticas em dentes decíduos utilizando o PCR. Sousa RBRA, Sousa DL, Gondim J, Duque TM, Moreira Neto JJS, Gomes BPFA. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada.

## CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE TRANSPORTE NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA

Evaluation of different transport media in maintaining of bacterial viability

Rebecca Bastos Rocha Araújo Sousa- Doutoranda em Odontologia- UFC

Email: rebeccabra@hotmail.com

Denise Lins de Sousa-Doutoranda em Odontologia-UFC

Email: lins.denise@yahoo.com.br

Thais Mageste Duque- Doutoranda em Clínica Odontológica-FOP-UNICAMP

Email: thaismageste@yahoo.com.br

José Jeová Siebra Moreira Neto- Doutor em Ciências Odontológicas, Professor Associado da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Email: jeova@ufc.br

Brenda Paula Figueredo Almeida Gomes- Pós-Doutora em Ciências Biológicas, Professora Associada da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP).

Email: bpgomes @fop.unicamp.br

Autor para correspondência:

Rebecca Bastos Rocha Araújo Sousa

R. Joaquim Nabuco 1889/400. Aldeota.

Cep 60125-120. Fortaleza, Ceará, Brasil.

Telefone: (85) 3264-5063/ (85) 3264-0242/ (85) 9955-9542

Email: rebeccabra@hotmail.com

Pesquisa com suporte financeiro da CAPES

## AVALIAÇÃO DE MEIOS DE TRANSPORTE NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA

### Resumo

**Objetivo:** Avaliar a viabilidade bacteriana em três meios de transporte Tris-EDTA (TE), fluido reduzido para transporte (RTF), e o *Viability Medium Göteborg Anaerobically* (VMGA III), simulando as condições de transporte da clínica ao laboratório, considerando o tempo decorrido entre a coleta e o processamento.

**Método:** Uma cepa padrão da *Porphyromonas gingivalis*, que é uma bactéria anaeróbia estrita de difícil cultivo, foi plaquada em Ágar fastidioso para anaeróbios (FAA), enriquecido com hemina, menadione e sangue de carneiro desfribinado. Após 72 horas, foi coletada e inserida em um meio Fastidioso para anaeróbios (FAB), ajustado na escala de Mc Farland (1.0). Em seguida inseridos cones de papel absorvente, estéreis, por um minuto, cada um, posteriormente posicionados em eppendorffs contendo, respectivamente, VMGA III, RTF e TE. Os eppendorffs® foram armazenados para posterior processamento, o inicial, plaqueamento imediato, para posterior comparação com os tempos de uma hora, duas e quatro horas.

**Resultados:** O processamento imediato serviu de base para as comparações. A contagem das colônias das amostras armazenadas em TE tendeu a zero na primeira hora e, após quatro horas, não se observou nenhuma colônia. Nas amostras armazenadas em RTF, houve uma redução 90% após a primeira hora em anaerobiose. Nas amostras armazenadas em VMGA III, registrou-se uma redução gradativa no número de colônias com redução de 40% após as quatro horas, mas ainda com viabilidade bacteriana.

**Conclusão:** O VMGA III permitiu um maior tempo de armazenamento da *Porphyromonas gingivalis* para posterior processamento por cultura, revelando-se, assim, como o melhor meio de transporte dentre os avaliados.

**Palavras-chave:** VMGAIII, transporte biológico, *Porphyromonas gingivalis*.

## Evaluation of different transport media in maintaining of bacterial viability

### **Abstract**

**Purpose:** The aim of this study was evaluate the reduction or loss of bacterial viability in three transport modes (TE, RTF and VMGA III), simulating the conditions of transport of microbiological samples from the dental clinic (bacterial collection) to the laboratory (processing samples), considering the time between the collection of bacterial strains and their processing.

**Method:** A standard *Porphyromonas gingivalis* (lyophilized), which is a strict anaerobe difficult to culture, grew in FAA enriched with hemin, menadione and defibrinated sheep blood. After 72 hours was then collected and placed in FAB broth, adjusted to McFarland scale (1.0). Thus, absorbent sterile paper cones were inserted for one minute each and later placed in eppendorffs containing, respectively, VMGA III, RTF and TE. The Eppendorf tubes were stored for further processing, for a comparison an immediate process was performed. Processing of the samples was performed during the time of one hour, two hours and four hours.

**Results:** It was performed a count on the immediate processing to make comparisons and percentage of colonies on the times evaluated. The counting of the colonies from samples stored in TE tended to zero in the first hour after four hours and no colony was observed. In samples stored in RTF reduced 90% after the first hour anaerobically. In samples stored in VMGA III, there was a gradual reduction in the number of colonies with a reduction of 40 % after four hours, but still with bacterial viability.

**Conclusion :** This study concluded that VMGA III has showed the best results for bacterial transport in microbiology.

**Key-words:** VMGAII, biological transport, Porphiromonas gingivalis

## 1. Introdução

É consenso na literatura que as bactérias são a principal causa das doenças pulpares e periapicais. Dessa forma, vários estudos têm sido realizados no intuito de descobrir quais os principais patógenos envolvidos nessas doenças, tanto por meio de técnicas microbiológicas quanto através da identificação do DNA/RNA bacteriano (1,2,3,4,5,6).

Porém, pouca atenção tem sido dada à importância dos procedimentos de coleta, transporte e armazenamento desses microrganismos. Sabe-se que, idealmente, as amostras devem ser plaqueadas até uma hora após sua coleta (7-12). Contudo, este procedimento nem sempre é possível, tornando-se extremamente necessária a utilização de um meio que permita um tempo mais prolongado de transporte e armazenamento.

O transporte das amostras é um dos passos iniciais para obtenção de culturas de microrganismos, devendo ser capaz de preservar a viabilidade bacteriana e a proporção inicial dos diferentes microrganismos coletados.

De acordo com os componentes dos meios de transporte, estes têm sido divididos em meios nutritivos e não-nutritivos (13).

Os meios não nutritivos são derivados de solução salina, podendo ser acrescidos de substâncias redutoras ou ágar. Exemplos desses meios são o RTF – Fluido Redutor para Transporte (7,9,10,13) e o RTFF – Fluido Reduzido para Transporte acrescido de extrato de Fildes a 10% (9).

Os meios nutritivos contêm substâncias nutritivas, como gelatina e tiotona, em pequenas quantidades. São exemplos de tais meios de transporte o VMGA III – *Viability medium, Göteborg, anaerobically* (7,9,10,11,12,13), TG – Caldo Tioglicolato (13), PY – Meio Extrato Fundo Peptona (13) e PYG – PY + glicose (13).

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade bacteriana em três meios de transporte (TE, RTF e VMGA III), simulando as condições de transporte da clínica ao laboratório, considerando o tempo decorrido entre a coleta e o processamento.

## 2. Materiais e métodos

Uma cepa padrão da *Porphyromonas gingivalis*, que é um MO anaeróbio de difícil cultivo, proveniente do laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, Brasil (FOP/UNICAMP), foi cultivada em placas contendo FAA (Ágar Fastidioso para Anaeróbio) enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado, hemina e menadione por 72h a 37°C, numa câmara de anaerobiose.

Após esse período, a cepa foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10ml de FAB (Caldo Fastidioso para Anaeróbio), sendo a suspensão bacteriana ajustada para a escala 1,0 de MacFarland ( $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias/ml).

Os meios de transporte utilizados foram VMGA III (Meio de Viabilidade de Göteborg), RTF (Fluido Reduzido para Transporte) e TE (Tris-EDTA), os componentes de cada um são visualizados na Tabela 1.

VMGA	RTF	TE
Acetato de fenilmercúrio, glicerofosfato de sódio, cloreto de cálcio hidratado, cloreto de potássio, cloreto de sódio, sulfato de magnésio hidratado Solução NaOH + KOH(8M) Triptose, Thiotone e Peptone Bacto Ágar 4% (DIFCO) Gelatina L- cisteína hidrocloreto, Ácido Tioglicólico	Fosfato de Potássio- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Cloreto de Sódio- $\text{NaCl}$ Sulfato de Magnésio - $\text{MgSO}_4$ EDTA $\text{Na}_2\text{CO}_2$ Dithiothreiol Resazurim	Tris-HCl EDTA

Tabela 1. Composição dos meios de transporte VMGA III, RTF e TE.

Em seguida, cones de papel absorvente estéreis foram imersos na suspensão bacteriana durante um minuto. Após esse período, os cones foram colocados em eppendorffs® contendo 2,5mL, respectivamente, no VMGA III, RTF e TE e armazenados nestes por uma hora, duas horas e quatro horas. O experimento foi realizado em duplicata, sendo armazenada na câmara de anaerobiose.

As amostras foram processadas de imediato, que era a referência para nossa comparação, em seguida nos tempos determinados. Os tubos contendo os inóculos foram levados a um agitador durante dois minutos para homogeneização. Após este procedimento, a amostra foi diluída seriadamente em tubos de diluição de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , sendo distribuídas uniformemente da menos diluída para a mais diluída. Cada tubo de diluição continha 900µl de FAB (Fastidious Anaerobe Broth) caldo onde foram acrescentadas, 100µl do inóculo ao primeiro tubo de diluição, e os tubos subsequentes receberam 1/10 do número de bactérias presentes no tubo anterior. Posteriormente, as amostras dos tubos foram transferidas para placas de Petri contendo FAA enriquecido de hemina, menadione e sangue de carneiro desfibrinado, semeadas e, após três dias de incubação, realizou-se a contagem visual das unidades formadoras de colônia.

### 3. Resultados

A quantidade de colônias obtidas no plaqueamento imediato considerou o valor de referência (100%) para comparação e determinação das amostras seguintes.

Para contagem das colônias, foi realizado um piloto onde a amostra foi diluída de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  e, assim, estabeleceu-se a diluição de  $10^{-3}$  como escolha para contagem das colônias. Os resultados estão representados na Quadro 1.

Analisando o TE como meio de transporte, observou-se uma redução de quase 100% nas colônias, após decorrido um período de uma hora

de armazenamento. Para o RTF, observou-se uma redução de mais de 90% após à primeira hora. Quanto ao VMGA III, após uma hora, 100% das colônias foram mantidas; após duas horas; 25% a menos; e, após quatro horas, observou-se uma redução de 44%.

Tempo decorrido entre coleta-cultura	Porcentagem de UFC em anaerobiose		
	1 TE	2 RTF	3 VMGA III
Imediato	100	100	100
1 hora	0,0016	1,6	100
2 horas	0,2	7,5	75
4 horas	0	0,2	66

Quadro 1. Porcentagem de UFC viáveis nos diferentes períodos de tempo analisados, quando armazenados em anaerobiose.

#### 4. Discussão

A manutenção da viabilidade bacteriana é o requisito fundamental de um meio de transporte, de tal forma que este permita a sobrevivência bacteriana, mas não proporcione seu crescimento. Meios como o de Stuart modificado (SBL), o VMG II, o RTF, o TE, o VMGA III, têm sido sugeridos (7,9-13), porém avaliaram-se neste estudo os meios RTF, TE e VMGA III, por serem os mais utilizados (7).

O TE tem sido utilizado como método de extração de DNA, obtendo resultados satisfatórios (13,14,15). Contudo, como se observa neste estudo, tal meio não se mostrou satisfatório para transporte bacteriano, não proporcionando a manutenção da viabilidade bacteriana em períodos curtos de tempo quando do uso da cultura para análise dessa microbiota.

O RTF tem sido descrito como um meio bastante utilizado para transporte de amostras oriundas do biofilme que ocasiona a doença periodontal (8,9,16,17) e relatou-se ser este o meio de transporte ideal para manutenção da viabilidade de bactérias que compõem a microbiota da doença periodontal, como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*. Contudo, no presente estudo, este meio não se mostrou favorável na manutenção da viabilidade bacteriana após a primeira hora de armazenamento.

O VMGA III tem sido utilizado satisfatoriamente tanto como meio de transporte quanto de armazenamento (10,18). Neste estudo, foi o meio que apresentou os melhores resultados, principalmente, quando a *Porphyromonas gingivalis* necessitou ficar armazenada por períodos de tempo mais longos, o que está em concordância com a literatura (10,19).

#### 5. Conclusão

Este estudo concluiu que o VMGA III permitiu um maior tempo de armazenamento da *Porphyromonas gingivalis* para posterior processamento por cultura, revelando-se, assim, como o melhor meio de transporte dentre os avaliados para processamento por cultura microbiológica.

## 6. Referências bibliográficas

1. Sousa DL, de Sousa RB, Pinto DN, Neto JJ, de Carvalho CB, de Almeida PC. Antibacterial effects of chemomechanical instrumentation and calcium hydroxide in primary teeth with pulp necrosis. *Pediatr Dent* 2011; Jul-Aug;33(4):307-11.
2. Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, 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.
3. Chugal N, Wang JK, Wang R, He X, Kang M, Li J, Zhou X, Shi W, Lux R. Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. *J Endod* 2011; Oct;37(10):1359-64.
4. 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. *JOE* 2008; May; Vol 34, (5).
5. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008; 34:268–72.
6. Jervøe-Storm P-M, Koltzsch M, Falk W, Doerfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005; 32:778–783.
7. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media, *Appl Microbiol* 1972; 24:638-644.
8. Deveaux E, Delplanque P, Neut C, Charon J, Romond C. In vitro survival of *Bacteroides intermedius* in five transport media, alone or in the presence of *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 320-323.
9. van Steenberg TJM, Petit MDA, Tjihof CJ, van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaff J. Survival in transport media of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in human subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 370-374.
10. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJ. A comparison between two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 375-382.
11. Moller AR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth, *Odontol Tidskr* 1966; 74: 1-380.
12. Hoover CI, Newbrun E. Survival of bacteria from human dental plaque under various transport conditions, *J Clin Microbiol* 1977; 6: 212-218.
13. Karthipan SN, George E, Jameela S, Lim WF, The LK, Lee TY, Chin VK, Lai MI. An assessment of three noncommercial DNA extraction methods from dried blood spots for beta-thalassaemia mutation identification. *Int. Jnl. Lab. Hem* 2011; 33, 540–544.
14. Hearn RP, Arblaster KE. DNA extraction techniques for use in education. *Biochem Mol Biol Educ* 2010; May;38(3):161-6.

15. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, Woods GL. Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005; May;43(5):2471-3.
16. Rêgo RO, Spolidorio DM, Salvador SL, Cirelli JA. Transmission of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* between Brazilian women with severe chronic periodontitis and their children. *Braz Dent J* 2007;18(3):220-4.
17. Deveaux E, Delplanque P, Neut C, Romond C, Tay F, Liu YB, Flynn MJ, Slots J. Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *Porphyromonas gingivalis* in subgingival specimens. *Oral Microbiol Immunol* 1992; Dec;7(6):344-8.
18. Tay F, Liu YB, Flynn MJ, Slots J. Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *Porphyromonas gingivalis* in subgingival specimens. *Oral Microbiol Immunol* 1992; Dec;7(6):344-8.
- 1.2 Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 365-371.

## CAPÍTULO 2

## IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS EM DENTES DECÍDUOS.

Bacterial profile of endodontic infections in primary teeth

Rebecca Bastos Rocha Araújo Sousa- Doutoranda em Odontologia

Email: rebeccabra@hotmail.com

Denise Lins de Sousa-Doutoranda em Odontologia -UFC

Email: lins.denise@yahoo.com.br

Thais Mageste Duque- Doutoranda em Clínica Odontológica FOP-UNICAMP

Email: [thaismageste@yahoo.com.br](mailto:thaismageste@yahoo.com.br)

Juliana Gondim – Doutora em Ciências Odontológicas, Professora Adjunta da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Email: jujukondim@yahoo.com.br

José Jeová Siebra Moreira Neto- Doutor em Ciências Odontológicas, Professor Adjunto da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Email: jeova@ufc.br

Brenda Paula Figueredo Almeida Gomes- Pós-Doutora em Ciências Biológicas, Professora Associada da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Email: bpgomes @fop.unicamp.br

Autor para correspondência:

Rebecca Bastos Rocha Araújo Sousa

R. Joaquim Nabuco 1889/400. Aldeota.

Cep 60125-120. Fortaleza, Ceará, Brasil.

Telefone: (85) 3264-5063/ (85) 3264-0242/ (85) 9955-9542

Email: rebeccabra@hotmail.com

Suporte financeiro da CAPES.

## IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS EM DENTES DECÍDUOS.

### Resumo

**Objetivo:** identificar a microbiota em infecções endodônticas primárias de dentes decíduos e relacionar a suas causas, seja traumatismos dentários ou cárie, às bactérias mais frequentes, através da técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

**Método:** o estudo foi realizado a partir de coletas na clínica de odontopediatria e as amostras processadas em laboratório. As amostras foram coletadas de 43 crianças, de dois a nove anos de idade, no período de março de 2011 a agosto de 2012. Foram incluídos 47 canais de pacientes normosistêmicos que apresentaram necrose pulpar com. Foram incluídos os dentes com no mínimo, dois terços de raiz e possíveis de serem restaurados. Foram excluídos pacientes que estavam fazendo uso de antibiótico terapia ou que o fez nos últimos três meses e pacientes com comportamento inadequado para a realização da pesquisa. Após a anestesia e isolamento absoluto, foi realizada desinfecção do campo operatório (peróxido de hidrogênio a 30%, hipoclorito de sódio a 2,5%, tiosulfato de sódio a 5%), previamente, ao acesso à polpa dentária, para coleta bacteriana. Para a coleta, foram introduzidas três pontas de papel absorventes, por um minuto cada uma. Os cones eram então imersos em VMGAIll e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento por PCR. Os resultados foram descritos em gráficos e quadros com a relação entre as causas e as bactérias estabelecidas a partir do teste Exato de Fisher.

**Resultados:** Os canais estavam divididos em 14,89 % incisivos e 38,29% de primeiros molares e 46,80% segundos molares. Foi então identificada uma microbiota composta de microrganismos, predominantemente, anaeróbios negativos ao teste de Gram. As bactérias mais frequentes foram: *Prevotella nigrescens* (17,92%), *Parvimonas micra* (16,24%) e *Actinomyces naeslundii* (12,88%). As menos frequentes foram: *Filifactor alocis* (1,12%), *Streptococcus mitis* (1,12%), *Enterococcus faecalis* (0,56%) e *Streptococcus mutans* (0,56%). Considerando a causa da necrose pulpar, a cárie associou-se a bactérias anaeróbias, como *Parvimonas micra* ( $p=0,036$ ) e, ao trauma, bactérias facultativas, como o *Streptococcus mitis* (0,022).

**Conclusão:** A amostra teve uma maior frequência de bactérias anaeróbias, negativas ao teste de Gram. A causa da necrose pode influenciar na constituição da microbiota, onde a cárie associa-se a bactérias anaeróbias positivas e negativas ao teste de Gram, como *Parvimonas micra* e *Treponema denticola*, e associam-se ao trauma as bactérias facultativas e positivas ao teste de Gram, como a *Tanarella forsythia*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*.

## Bacterial profile of endodontic infections in primary teeth

### Abstract

**Objective:** Identify the microbiota in primary endodontic infections in deciduous teeth and relate to their causes, trauma or dental caries, the most common bacteria, through the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). **Method :** The study was conducted from collections in pediatric dentistry clinic and samples processed in the laboratory. Samples were collected from 43 children aged two to nine years, from March 2011 to August 2012. 47 channels healthy patients who presented with pulp necrosis were included. Teeth with at least two-thirds of root and possible to be restored were included. Patients who were making use of antibiotic therapy or who made the last three months and patients with inappropriate behavior for the research were excluded. After anesthesia and absolute isolation, disinfection of the operative field (hydrogen peroxide 30%, sodium hypochlorite 2.5%, sodium thiosulfate 5%) was performed previously, access to dental pulp to bacterial collection. For collecting three tips of absorbent paper were introduced for one minute each. The cones were then immersed in VMGAIII and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later processing by PCR. The results were described in tables and graphs, the relationship between the causes and the bacteria established from the Fisher exact test. **Results:** The channels were divided into incisors 14.89 % to 38.29 % from 46.80% the first molars and second molars. Then identify a microbial organisms comprising predominantly anaerobic Gram negative for the test. The most common bacteria were *Prevotella nigrescens* (17.92%), *Parvimonas micra* (16.24%) and *Actinomyces naeslundii* (12.88%). Less frequent were *Filifactor alocis* (1.12%), *Streptococcus mitis* (1.12%), *Enterococcus faecalis* (0.56%) and *Streptococcus mutans* (0.56%). Whereas the cause of pulp necrosis, caries was associated with anaerobic bacteria, as *Parvimonas micra* ( $p = 0.036$ ), and trauma, facultative bacteria, such as *Streptococcus mitis* (0.022). **Conclusion:** The sample had a higher frequency of the Gram negative anaerobic bacteria test. The cause of necrosis may influence the establishment of the microbiota, where the decay is associated with positive and negative anaerobic bacteria to the Gram test, as *Parvimonas micra* and *Treponema denticola*, and are associated with the trauma and positive facultative bacteria to the Gram test such as *Forsythia*, *Tanarella*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis*.

**Descriptores:** , PCR, microorganisms.

## 1. Introdução

Os dentes decíduos, ao longo de seu ciclo vital, sofrem desafios causados por bactérias ou mesmo traumas que podem levar à necrose pulpar que, em muitos casos, é o motivo de perdas precoces (1-4).

A cavidade bucal apresenta um ecossistema variado de microrganismos (MO), com uma microbiota diferente para cada nicho bucal (5,6). Os biofilmes bucais são causadores de doenças como cárie e periodontites (5), sendo estas capazes de progredir e levar à necrose pulpar. Além das cáries, na dentição decídua, a necrose pulpar é, frequentemente, ocasionada por traumatismos dentários, acarretando, em até 25% dos casos, necessidade de uma intervenção endodôntica (1-3). Todavia, cárie e trauma têm características clínicas diferentes. Nas cáries, as bactérias iniciam a colonização pelo biofilme da placa bacteriana (6) e constituem-se, inicialmente, de aeróbios facultativos, como os *Streptococcus*, e vão sendo modificados com a união das *Fusobacterium*, que funcionam como uma transição para a nova microbiota anaeróbia (5), enquanto que, nas necroses por trauma, não há uma colonização pela placa dentária seguindo para o canal radicular.

A Infecção endodôntica pode acarretar a perda precoce (2) e, em dentes decíduos, sequelas nos dentes permanentes. Conhecer as espécies bacterianas colonizadoras e causadoras dessa infecção é importante na busca de terapias que minimizem suas sequelas (7-20).

As terapias endodônticas em dentes decíduos buscam evitar as perdas e sequelas aos germes dos dentes sucessores (4). Elas baseiam-se na diminuição e inviabilização dos microrganismos (21-23) e, para que possam ser cada vez mais eficazes, faz-se necessária a identificação da microbiota que desafia o equilíbrio desses elementos, pois, assim, as medicações utilizadas serão mais eficientes.

Vários trabalhos avaliaram a microbiota de dentes permanentes (7-9, 11-13, 15-20). Entretanto, na dentição decídua, poucos estudos foram relatados (10,11,14,). Sugere-se existir uma diferença na colonização bacteriana de acordo com a idade e dentição do paciente (decídua e permanente) (6), bem como, na microbiota da cavidade bucal saudável ou com doença cárie ou periodontal (5,10). Parece existir, ainda, uma diferença na microbiota de acordo com a causa da necrose pulpar por cárie ou por trauma. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo identificar espécies bacterianas presentes nas infecções endodônticas primárias de dentes decíduos considerando as causas que a ocasionaram.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Universo da Amostra

A amostra deste trabalho consistiu-se de 43 pacientes, de dois a nove anos de idade, que apresentavam dentes decíduos com infecções endodônticas primárias e que buscaram atendimento na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, no período de abril de 2011 a agosto de 2012. Foram incluídos neste trabalho os pacientes presumivelmente saudáveis, após

anamnese e diagnóstico de necrose pulpar. Os dentes deveriam apresentar o mínimo de dois terços de raiz e serem passíveis de restauração. Os pais ou responsáveis pela criança eram então informados sobre a pesquisa e convidados a participar através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE F). O entendimento e assinatura do TCLE incluíam o paciente na pesquisa. Foram excluídos os pacientes que relataram ter feito uso de antibióticos sistêmicos nos três últimos meses, dentes que não tinham condições clínicas de serem restaurados, dentes que apresentavam lesões periapicais com ruptura da cripta do germe do permanente com, dentes reabsorções com envolvimento de furca. Foram retirados do estudo pacientes com comportamento inadequado para a realização dos procedimentos ou aqueles que por algum motivo desistiram de participar da pesquisa.

A necrose foi determinada a partir de exames clínicos e radiográficos. Clinicamente, os dentes deveriam apresentar cavidade de cárie extensa ou história prévia de trauma, podendo apresentar o escurecimento da coroa dentária, alteração da coloração da mucosa, fístula e mobilidade grau II.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará, de Fortaleza, Ceará, Brasil, pelo protocolo de número: 224/10.

## **2.2 Coleta das amostras**

Inicialmente, o paciente foi submetido a uma sessão de condicionamento psicológico. Nesta, foram realizados anamnese, exames clínico e radiográfico. A partir dessa radiografia, foi determinada a odontometria para a realização das coletas microbiológicas. As coletas das amostras foram descritas em estudos anteriores (10,21) com algumas modificações. Na sessão seguinte, o paciente foi submetido à anestesia tópica, seguida da infiltrativa (Mepivacaína Mepiadre 2%) com vaso constritor – DFL, Indústria e Comércio S.A., Brasil) para realização do isolamento absoluto. Em seguida, foi realizada a desinfecção do campo operatório, utilizando cotonetes estéreis umedecidos com peróxido de hidrogênio a 30%, seguido do hipoclorito de sódio a 2,5%, ambos por um minuto. Essas substâncias foram inativadas com Tiosulfato de sódio a 5%, evitando assim uma contaminação cruzada no momento da coleta bacteriológica. Foi realizada a abertura da câmara coronária utilizando broca esférica diamantada de alta rotação (KG Sorensen Indústria e Comércio, São Paulo, São Paulo, Brasil) sendo irrigada, manualmente, com solução salina estéril.

Após abertura, foi introduzida uma lima inicial (#10 ou #15, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) para desobstruir o canal e permitir a coleta bacteriana (CB). Para determinação da odontometria, foi utilizado o localizador apical (Novapex) estabelecendo o comprimento de trabalho a 1mm do ápice radicular. A coleta foi realizada da seguinte forma: foram introduzidos, sequencialmente, três cones de papel absorvente, de diâmetro compatível com o canal radicular. Cada cone permaneceu no interior dos canais radiculares por um minuto. Nos dentes multiradiculares, o canal para a coleta nos molares inferiores foi o distal, e nos superiores, o palatino. Caso o canal não estivesse úmido, este foi umedecido com solução salina estéril para uma adequada coleta. Em seguida, os cones foram imediatamente inseridos no interior de eppendorffs® contendo 2mL de uma solução de transporte, VMGAIll, e congelados no freezer a - 80°C para posterior processamento das amostras microbiológicas.

### 2.3 Processamento das amostras

Para a realização da PCR e identificação da microbiota, as amostras foram processadas em setembro de 2012 no laboratório da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, Brasil (UNICAMP), havendo amostras congeladas por períodos variando de 15 dias a um ano e seis meses. Transportadas através em gelo seco, em laboratório estas foram descongeladas e homogeneizadas. Uma alíquota de 300µL foi processada para extração do DNA utilizando-se o Mini Kit QIAamp (Qyagen, Hilde, Alemanha), conforme as instruções do fabricante e protocolo estabelecido no Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP, UNICAMP). A amostra-mãe foi centrifugada a 8000rpm/cinco minutos, o sobrenadante foi removido e iniciou-se o processo de extração de DNA bacteriano com a adição de 180µL de ATL e 20 µL de Proteinase K ao pellet. A amostra foi agitada e incubada a 56°C por 30 minutos; sendo adicionados 200µL de AL, agitados e incubados a 70°C por dez minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de etanol (álcool etílico) 100%, agitados e transferidos para tubos com filtros/coluna do Kit (QIAamp Mini Spim Collum), sendo novamente centrifugados a 8000rpm/um minuto; transferido o filtro para outro tubo vazio. Neste momento, foram adicionados 500µL de AW1, centrifugados a 800rpm/um minuto e, posteriormente, o filtro foi transferido para outro tubo vazio, onde foram adicionados 500µL de AW2, centrifugados a 13000rpm/três minutos e transferidos para um eppendorff® normal de 1,5mL com tampa. Foram adicionados 10µL de AE (eluyente), permanecendo três minutos em repouso. A amostra foi então centrifugada a 8000rpm/um minuto e assim o filtro foi descartado e o DNA extraído, armazenado no eppendorff® a -20°C.

A concentração de DNA bacteriano (ng), por amostra, foi determinada pelo uso de um espectrofotômetro (NanoDrop 2000; Thermo Sc, Wilmington, DE, USA) para posterior realização da PCR.

A PCR foi processada com um volume total de 25µL para cada bactéria a ser identificada. O "Mix" foi composto de 2.5µL de 10×Taq buffer (1×) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), 0.5µL of DNTP (100mM de cada: dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), 1.25µL de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Eugene, OR, USA), 0.25µL de forward e reverse dos primers (0.2µM) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), 2.0µL da amostra do DNA, 0.125µL da Taq DNA polymerase (1 U) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), e para completar a solução 18.1µL de água MiliQ, livre de DNA.

As espécies bacterianas investigadas neste estudo, as sequências dos pares de bases dos primers (Biosynthesis, Lewisville, TX) utilizados, os pesos dos pares de bases, os ciclos realizados para cada bactéria específica e suas respectivas referências estão descritos na Quadro 1. Para todas as PCRs, como controle negativo, foi utilizado um mix (Tampão, DNTPs, MgCl<sub>2</sub>, primers forward e reverse, taq Platinum e água). Inicialmente, todas as amostras, individualmente, foram processadas com o ribossomo universal 16S (16SrDNA) (9), para verificação da existência bacteriana (Quadro 1).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em um gel de agarose a 1% adicionado o brometo de etídio, visualizado sob a transluminação de luz ultravioleta. A identificação da espécie bacteriana foi realizada a partir da comparação das imagens das bandas produzidas pelos

produtos da reação com as imagens do DNA Ladder (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Espécie Bacteriana	Seqüências dos Primers (5' to 3')	Peso (bp)	Ciclos da PCR	Referências
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Forward: GCGCCTTTTTTGGTGTTTTTGG Reverse: CACCCACAAACGAGGCAGGCCTG	274	Desnaturação inicial a 94°C por 1 min e 35 ciclos de : 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 90s e último passo a 72°C por 10 min.	Xia e Baumgartner, 2003
<i>Dialister pneumosintes</i>	Foward: TTC TAA GCA TCG CAT GGT GC Reverse: GAT TTC GCT TCT CTT TGT TG	1105	Desnaturação a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 55°C por 1min, 72°C por 2min último passo a 72°C por 2min.	Siqueira e Roças, 2004
<i>Enterococcus faecalis</i>	Foward: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G Reverse: CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	138	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 95°C por 1min, 57°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 7min.	Sedgley et al, 2005
<i>Filifactor alocis</i>	Foward: CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG Reverse: CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG	594	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 26 ciclos de: 95°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 2min.	Siqueira e Roças, 2004
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Foward: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G Reverse: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	1000	Desnaturação inicial a 95°C por 5min e 30 ciclos de: 94°C por 30s, 40°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 10min.	Avilla-Campos et al, 1999
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Foward: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG Reverse: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	207	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C for 10min.	Conrads et al, 1997
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Foward: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC Reverse: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C for 10min.	Siqueira et al, 2001
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Foward: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Reverse: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 2min.	Siqueira et al, 2001
<i>Prevotella intermédia</i>	Foward: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG Reverse: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 10 min.	Siqueira et al, 2001
<i>Prevotella nigrescens</i>	Foward: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG Reverse: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804	Desnaturação inicial a 95°C por 2min and 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 10min.	Siqueira et al, 2001
<i>Streptococcus mitis</i>	Foward: GTC GAA GGT GAT GAT ATG AC Reverse: GAC AGT ACG CAG TCT TAC GTC	372	Desnaturação inicial a 94°C por 2min e 30 ciclos de: 94°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final de 72°C por 10 min.	Garnier et al, 1997
<i>Streptococcus mutans</i>	Forward: ATT GAA GGC GAG CCT TTA GAA AG Reverse: CTA GGA CAA TAG CAA C	351	Desnaturação inicial a: 94°C por 2min e 30 ciclos de: 94°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 10min.	Garnier et al, 1997
<i>Streptococcus sanguis</i>	Foward: GTC GAT GGC GAG GAT CTA	208	Desnaturação inicial a 94°C por	Garnier et al,

	GAG C Reverse: TGC CGA GCG CTC TAA CTC CA		2min e 30 ciclos de: 94°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 10min.	1997
<i>Tannerella forsythia</i>	Foward: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA Reverse: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641	Desnaturação inicial a 95°C por 1min and 36 ciclos de: 95°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 2min.	Slots et al, 1995
<i>Treponema denticola</i>	Foward: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min, e o passo final a 72°C por 10min.	Siqueira et al, 2001
Universal 16S rDNA	Foward: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T Reverse: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466	Desnaturação inicial a 95°C por 10min e 40 ciclos de: 95°C por 10s, 60°C por 10s e o passo final a 72°C for 25s	Viana et al, 2006

Quadro 1. Descrição das espécies bacterianas com suas sequências de pares de bases dos primers, peso dos pares de base específicos, ciclos para amplificação e anelamento para cada espécie e suas respectivas referências bibliográficas.

Os dados obtidos foram analisados pelo EPI INFO V. 7.0 disponível em cdc.gov. O Exato de Fisher foi escolhido para realizar as associações entre as causas da necrose pulpar, cárie e trauma, e as espécies bacterianas.

### 3. Resultados

Dos 43 pacientes avaliados, foram coletados 50 canais radiculares de dentes decíduos com infecções endodônticas primárias, sendo que em três canais não foram identificados sinais positivos de espécies bacterianas, sendo estes excluídos, restando 47 amostras dos canais coletados.

A nossa amostra foi composta de crianças com idade variando entre 2,75 e 9,8 anos, e média de  $6,7 \pm 1,97$  anos. Os incisivos centrais corresponderam a 14,9% da amostra, os primeiros molares decíduos a 38,3% e os segundos molares decíduos, a 46,8%. Em relação às causas das infecções, 15,6% delas foram ocasionadas por traumatismos dentários e 84,4% por cárie. Destas, 4,4% apresentavam escurecimento coronário, 13,3% apresentavam sintomatologia dolorosa, 6,7%, abscesso no momento da coleta e 43,7%, fístula.

As espécies avaliadas foram encontradas em pelo menos um canal radicular. A frequência das espécies pode ser observada no Figura 1. Em relação à coloração de Gram e metabolismo respiratório, 55,05% das espécies foram negativas e 77,8% composta por anaeróbios. A *Parvimonas micra* (N=31; 16,24%), a *Prevotella nigrescens* (N=33; 17,92%), a *Actinomyces naeslundii* (N= 23; 12,88%), a *Fusobacterium nucleatum* (N=20; 10,64%) e a *Tanarella Forsythia* (N= 16; 8,96%) foram as mais frequentes (Figura 1), enquanto que o *Enterococcus faecalis* (N=1; 0,56%) e o *Streptococcus mutans* (N= 1; 0,56%) foram os menos frequentes. Nos canais necrosados por cárie, os microrganismos mais frequentes foram *Parvimonas micra* (73%) e *Prevotella nigrescens* (75,7%), não sendo encontrados a *Prevotella intermedia*, o

*Streptococcus mitis* e o *Streptococcus mutans*. Nos dentes necrosados por trauma, os mais frequentes foram *Tanarella Forsythia* (71,4%), *Actinomyces naeslundii* (71,4%), *Fusobacterium nucleatum* (57,2%) e a *Prevotella nigrescens* (57,1%), não sendo observado o *Filifactor alocis*, nem o *Treponema denticola*.

Comparando a microbiota levando-se em consideração a causa da necrose, a partir do teste Exato de Fisher ( $p < 0,05$ ), observou-se que a *Parvimona micra* ( $p = 0,036$ ) está associada aos dentes necrosados por cárie e o *Streptococcus mitis* associa-se aos canais necrosados após traumatismos dentários ( $p = 0,022$ ). A *Tanarella forsythia* e *Streptococcus sanguis*, apresentaram uma tendência de maior frequência nos dentes necrosados por trauma ( $p = 0,055$  e  $p = 0,068$ , respectivamente) (Quadro 2).

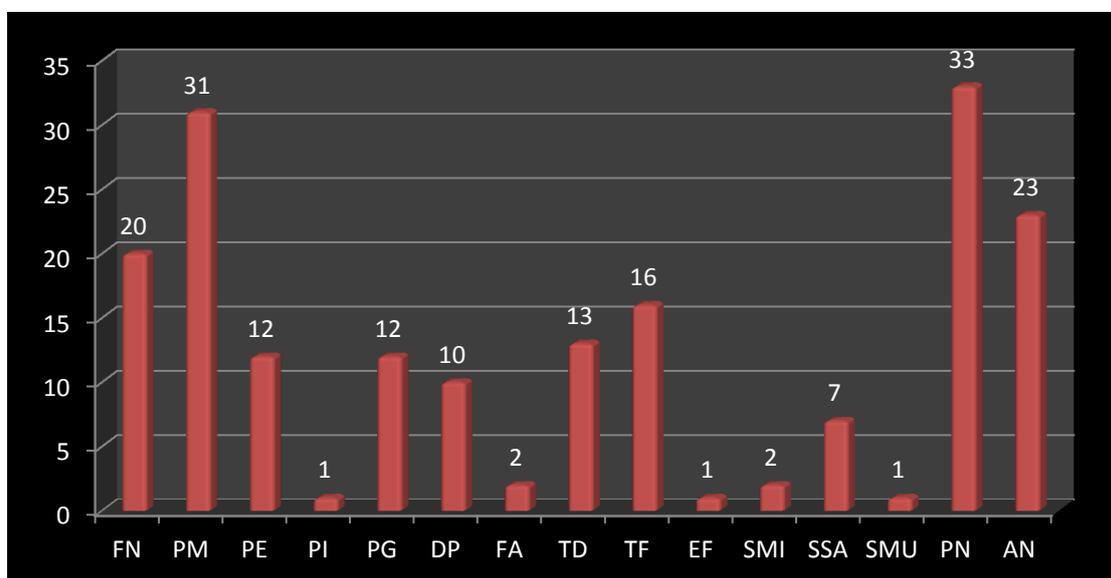


Figura 1. Frequência de Microrganismos presentes em infecções endodônticas primárias em dentes decíduos. FN, *Fusobacterium nucleatum*; PM, *Parvimona micra*; PE, *Porphiromonas endodontalis*; PI, *Prevotella intermedia*; PG, *Porphiromonas gengivalis*; DP, *Dislister pneumonsites*; FA, *Filifactor alocis*; TD, *Treponema denticola*; TF, *Tanarella forsythia*; EF, *Enterococcus faecalis*; SMI, *Streptococcus mitis*; SSA, *Streptococcus mutans*, SMU, *Streptococcus mutans*; PN, *Prevotella nigrescens*, AN, *Actinomyces naeslundii*.

	Classificação		NECROSE		P
			CÁRIE N(%)	TRAUMA N(%)	
<i>Enterococcus faecalis</i> - ausência - presença	Gram +	Anaeróbio	16(41,0)	3(42,9)	0,744
			23(59,0)	4(57,1)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> -ausência	Gram -	Anaeróbio	22(59,5)	3(42,8)	0,343
			15(40,5)	4(57,2)	

-presença					
<i>Parvimonas micra</i> -ausência -presença	Gram +	Anaeróbio	10(27,0) 27(73,0)	5(71,4) 2(28,6)	0,036
<i>Porphiromonas endodontalis</i> -ausência -presença	Gram -	Anaeróbio	27(73,0) 10(27,0)	5(71,4) 2(28,6)	0,628
<i>Porphiromonas gingivalis</i> -ausência -presença	Gram -	Anaeróbio	28(75,7) 9(24,3)	5(71,4) 2(28,6)	0,571
<i>Dialister pneumosintes</i> -ausência -presença	Gram -	Anaeróbio	28(75,7) 9(24,3)	6(85,7) 1(14,3)	0,491
<i>Filifactor alocis</i> -ausência -presença	Gram +	Anaeróbio	35(94,6) 2(5,4)	7(100,0) 0(0,0)	0,704
<i>Treponema denticola</i> -ausência -presença	Gram -	Aeróbio	25(67,6) 12(32,4)	7(100,0) 0(0,0)	0,088
<i>Prevotella intermedia</i> -ausência -presença	Gram -	Anaeróbio	37(100,0) 0(0,0)	6(85,7) 1(14,3)	0,159
<i>Tanarella forsythia</i> -ausência -presença	Gram +	Facultativo	25(69,4) 11(30,6)	2(28,6) 5(71,4)	0,055
<i>Streptococcus mitis</i> -ausência -presença	Gram +	Facultativo	37(100,0) 0(0,0)	5(71,4) 2(28,6)	0,022
<i>Streptococcus sanguis</i> -ausência -presença	Gram +	Facultativo	33(89,2) 4(10,8)	4(57,1) 3(42,9)	0,068
<i>Streptococcus mutans</i> -ausência -presença	Gram +	Facultativo	37(100,0) 0(0,0)	6(85,7) 1(14,3)	0,159
<i>Prevotella nigrescens</i> -ausência -presença	Gram -	Anaeróbio	9(24,3) 28(75,7)	3(42,9) 4(57,1)	0,282
<i>Actinomyces naeslundii</i> -ausência -presença	Gram +	Anaeróbio	19(51,4) 18(48,6)	2(28,6) 5(71,4)	0,246

Quadro 2. Distribuição da frequência das espécies bacterianas e a associação com a causa da infecção endodôntica utilizando o Exato de Fisher.

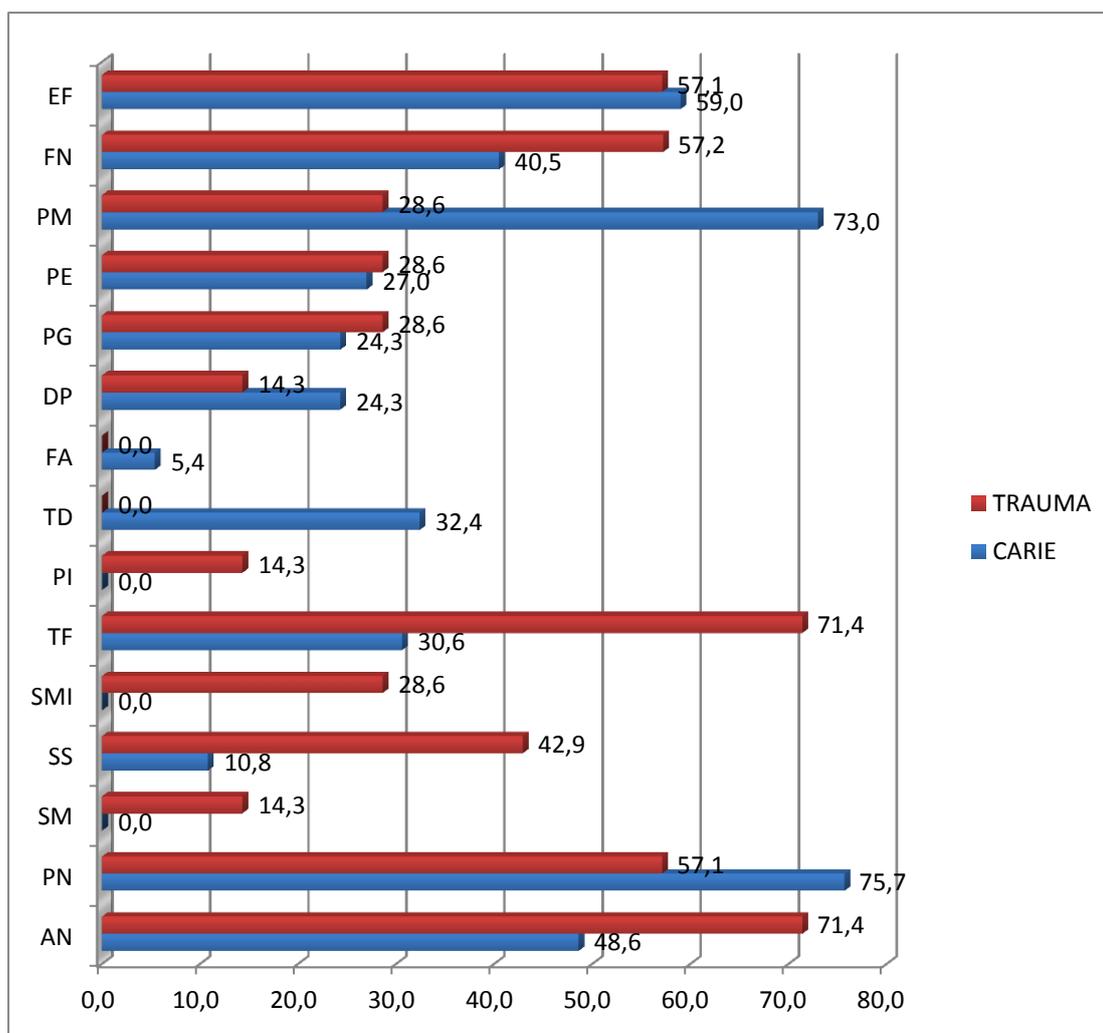


Figura 2. A frequência das espécies bacterianas : AN, *Actinomyces naeslundii*; PN, *Prevotella nigrescens*; SM, *Streptococcus mutans*; SS, *Streptococcus sanguis*; SMI, *Streptococcus mitis*; TF, *Tanarella forsythia*; PI, *Prevotella intermedia*; TD, *Treponema denticola*; FA, *Filifactor alocis*; DP, *Dislister pneumonsites*; PG, *Porphiromonas gengivalis*; PE, *Porphiromonas endodontalis*; PM, *Parvimona micra*; FN, *Fusobacterium nucleatum*; EF, *Enterococcus faecalis* relacionando às causas das infecções endodônticas.

#### 4. Discussão

O desejo de identificar a microbiota de dentes necrosados ou mesmo um grupo delas que esteja associado a alguma sintomatologia clínica faz desse um tema recorrente nos estudos (5-20). As infecções endodônticas, na dentição permanente têm sido amplamente discutidas (7-9, 11-13, 15-20), enquanto que em dentes decíduos são menos frequentes (10,11,14, 21,22). O avanço nas técnicas e medicações utilizadas em infecções endodônticas de dentes permanentes (23) encoraja o estudo para identificação das espécies bacterianas na dentição decídua (21,22) e, assim a escolha de medicações intracanaís eficientes que permitam um maior período desses dentes na cavidade bucal.

Há poucos trabalhos utilizando a PCR seguida da eletroforese, avaliando um número expressivo de espécies (7,8,9). A PCR é uma técnica

capaz de identificar pequenas amostras de DNA, por essa especificidade ela avalia uma única bactéria. Outras técnicas como o Checkerboard são capazes de avaliar 40 em uma única reação (13-16), todavia há necessidade de grandes quantidades de DNA bacteriano, sendo o canal radicular de um dente decíduo estreito acredita-se que o PCR seja eficiente para essa detecção (11). Além disso, o custo da PCR ainda é alto e uma contaminação ou falha nos ingredientes do “mix” pode causar a perda de todo o experimento.

Neste trabalho, as amostras apresentaram pelo menos uma e, no máximo, nove das 15 espécies bacteriana investigadas. A microbiota dos dentes decíduos necrosados foi, predominantemente, composta de anaeróbios (77,28%) e 55,05% foram negativas à coloração de Gram, o que se assemelha aos achados em dentes permanentes (7,9,12). As espécies bacterianas mais frequentes nos canais de dentes decíduos necrosados foram *Prevotella nigrescens* (17,92%), seguida da *Parvimonas micra* (16,24%), *Actinomyces naeslundii* (12,88%), *Fusobacterium nucleatum* (10,64%) e *Tanarella Forsythia* (8,96%).

A *P. nigrescens* e a *T. forsythia*, espécies pouco identificadas em estudos anteriores, vêm sendo relatadas em necroses após a utilização de técnicas de biologia molecular, sendo esta última anaeróbia de difícil cultivo (9). A *F. alocis* (1,12%), a *S. mitis* (1,12%), a *P. intermedia* (0,56%), a *S. mutans* (0,56%) e a *E. faecalis* (0,56%) não foram frequentes nas necroses de dentes decíduos. A *E. faecalis* está associada aos casos de insucessos endodônticos, nas infecções secundárias, o que não descreve as características clínicas de nossos pacientes (24). Foi demonstrado que, em coletas microbiológicas, em dentina cariada, quanto mais próxima à cavidade pulpar, menor a concentração dos *Streptococcus* (10), o que justifica os achados deste trabalho.

A *naeslundii*, MO associada às infecções crônicas, muitas vezes na presença de exudato purulento (10), foi identificada em 12,88% das amostras, com pouca frequência em infecções primárias (25). Algumas associações são realizadas para interpretar sinais clínicos das infecções. Assim, a *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. gingivalis* formam o complexo vermelho, sendo este responsável por condições clínicas como mobilidade, lesões periapicais e sintomatologia dolorosa. Esse complexo não foi identificado em nossas amostras de dentes decíduos (5).

Podem-se justificar as diferenças de microbiota observadas em nosso estudo em comparação com os da literatura, em função de alguns aspectos: Região estudada, hábitos alimentares, nível social e hábitos de higiene (5) e resistência a infecções bacterianas. Além disto, essa variação na microbiota pode ser explicada por uma questão ecológica e de associação bacteriana que inviabilizam a colonização de algumas espécies. Outro aspecto consiste no momento da coleta em relação à evolução da patologia que pode apresentar MOs de espécies diferentes (10).

A ideia de uma evolução ecológica bacteriana sugere colonização diferente para cada causa de necrose pulpar. A cárie, inicialmente constituída de uma microbiota de aeróbios facultativos, como os *Streptococcus*, vai-se modificando (5), enquanto nas necroses por trauma não há colonização pela

placa dentária, o que dificulta o entendimento da origem da infecção nestes casos.

No presente trabalho, pode-se verificar uma predominância de espécies bacterianas negativas para o teste de Gram, o que está de acordo com a literatura (26). Houve maior frequência de MO anaeróbios nos dentes necrosados por cárie, e nos dentes necrosados por trauma houve uma correlação com bactérias facultativas. Vale ressaltar que este achado pode-se dever à pequena amostra de dentes necrosados por trauma.

Em relação à metodologia deste trabalho, o primeiro desafio consistiu em realizar o procedimento clínico com a colaboração do paciente. Outro aspecto importante está relacionado à anatomia dos dentes decíduos, cujo diâmetro e a curvatura dos canais radiculares muitas vezes são complicadores para que se atinja o terço mais apical.

Assim, pode-se concluir, com este trabalho que há diferenças entre a microbiota de dentes decíduos necrosados, variando de acordo com as causas.

Agradecimentos a CAPES pelo suporte financeiro fornecido a essa pesquisa.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Sandalli N, Cildir S, Guler N. Clinical investigation of traumatic injuries in Yeditepe University, Turkey during the last 3 years. *Dent Traumatol* 2005; 21: 188–194.
2. Anyanechi C, Chukwuneke F. Survey of the reasons for dental extraction in eastern Nigeria. *Ann Med Health Sci Res* 2012 2(2):129-33.
3. Cardoso M, Rocha MJC. Federal University of Santa Catarina follow-up management routine for traumatized primary teeth – part 1. *Dent Traumatol* 2004; 20: 307–313.
4. Rocha MJC, Cardoso M. Federal University of Santa Catarina endodontic treatment of traumatized primary teeth – part 2. *Dent Traumatol* 2004; 20: 314–326.
5. Papaioannou S, Gizan S, Haffajee AD, Quiryynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 183-189.
6. Gizani S, Papaioannou W, Haffajee Ad, Kavvadia K, Quiryynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2009; 19: 193-200.
7. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:211-215.

8. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Sousa-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004, 19: 71-76.
9. Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase Chain Reaction of *Phorphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in Primary Endodontic Infections. *J Endod* 2007; 33:1049-1052.
10. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Pater BJ. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (4): 1407-1417.
11. 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; 106: 443-9.
12. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 1999; 25 (5):413-415.
13. Moraes SR, Siqueira Jr JF, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of the Effectiveness of Bacterial Culture, 16S rDNA Directed Polymerase Chain Reaction, and Checkerboard DNA-DNA Hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in Endodontic Infections. *Journal of Endodontics* 2002; 28:86-9.
14. Nelson-Filho PN, Ruvierre DB, Leonardo MR, Silva LAB, Ito IY. Assessment of the microbiota in root canals of Human Primary Teeth by Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of Dentistry for children* 2007; 74:118-23.
15. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological Profile of Symptomatic Teeth with Primary Endodontic Infections. *J Endod*, 2008 (34); 541-545.
16. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A Microbiological Profile of Unexposed and Exposed Pulp Space of Primary Endodontic Infections by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Endod* 2012;38:889–893.
17. Siqueira JF, Rôças IN, Oliveira JCN, Santos KRN. Molecular Detection of Black-Pigmented Bacteria in Infections of Endodontic Origin. *Journal of Endodontics* 2001; 27(9):563-566.
18. Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* Species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in Primary Root canal infection. *Journal of Endodontics* 2002; 28 (3): 168-172.
19. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in Infections of Endodontic Origin. *Journal of Endodontics* 2003; 29 (9): 549-522.
20. 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; 23: 384–390.
21. Sousa DLS, Sousa RBRA, Pinto, DN, Moreira Neto JS, Carvalho CBM, Almeida PC. Antibacterial Effects of Chemomechanical Instrumentation and Calcium Hydroxide in Primary Teeth With Pulp Necrosis. *Pediatric Dentistry* 2011; 33:301-31.
22. Gondim JO, Avaca-Crusca JS, Valentini SR, Zanelli C, Spolidorio DMP, Giro EMA. Effect of a calcium hydroxide/chlorhexidine paste as intracanal dressing

- in human primary teeth with necrotic pulp against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Paediatric Dentistry* 2012; 22.
23. Law A, Messer H, An Evidence-Based Analysis of the Antibacterial Effectiveness of Intracanal Medicaments. *Journal of Endodontics*. 2004; 30: 689-694.
  24. Gomes BPF, 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* 2006;102:247-53.
  25. Sassone LM, Fidel R, Favari M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological Evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod Journal* 2008; 41:508-515.
  26. Ruvieré DB, LeonardoMR, Silva LAB, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the Microbiota in Root Canals of Human Primary Teeth by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Dent Child* 2007;74:118-23.

## DISCUSSÃO

Os dentes decíduos são importantes para a manutenção da saúde e função oral de crianças. Assim, a terapia endodôntica é um tratamento que permite a esses elementos mais tempo na cavidade oral, mantendo sua função.<sup>2</sup> Na literatura, muito se lê sobre identificação bacteriana, mudanças de técnicas de instrumentação, materiais obturadores e medicações das terapias endodônticas envolvendo a denteição permanente,<sup>5,6,8-10,12,19</sup> enquanto que os decíduos são pouco discutidos.<sup>7,11,15,18,27-32</sup> A descrição dos microrganismos que colonizam os canais radiculares de dentes decíduos é fundamental na decisão das terapias a serem realizadas. Portanto, o presente estudo se propôs realizar esta análise utilizando uma técnica de Biologia Molecular amplamente empregada, capaz de identificar pequenas quantidades de DNA bacteriano.

O PCR é uma técnica que permite a avaliação precisa do DNA bacteriano. Tem como limitação permitir a avaliação de um microrganismo por vez.<sup>6,8,9-12,27</sup> Utiliza um aparelho, o termociclador, que faz um processo de aquecimento e resfriamento específico para cada sequência de DNA de uma bactéria. É uma técnica que requer controle da contaminação, sendo ideal realizar um controle positivo e um negativo para assegurarmos a identificação bacteriana. O tempo é seu limitador, pois, após o ciclo, algumas vezes de quase três horas, ao corrermos os resultados na eletroforese, verifica-se a contaminação cruzada, por exemplo, ou a não realização do ciclo por uma desatenção no preparo do mix (Buffer + Água Pura + DNTPs + MgCl<sub>2</sub> + Primer F + Primer R + Taq Polimerase + Amostra), que deve conter as quantidades precisas. Todavia, das bactérias examinadas, apenas a *S. mitis*, a *S. mutans* e a *T. forsythia* apresentavam ciclos longos. Sabe-se que existem outras técnicas de PCR, como o PCR-Real time, que quantifica o DNA bacteriano, além de identificar e o Nested-PCR;<sup>31</sup> que é capaz de avaliar quantidades ainda menores de DNA bacteriano, pois replica as cadeias de nucleotídeos, aumentando o DNA bacteriano. Há, também, técnicas que avaliam mais de uma cepa bacteriana por amostra em um mesmo processo, como no Checkerboard,<sup>5,7</sup> sendo neste necessária uma quantidade maior, em peso molecular de DNA. Todavia, são técnicas de custo mais elevado.

A escolha do meio de transporte e armazenamento desses microrganismos foi realizada a partir de achados na literatura, onde se observou o uso frequente de TE, RTF e VMGA III. O meio ideal deve apresentar características como armazenar e manter íntegras as bactérias, sem permitir o crescimento bacteriano. Assim, realizou-se uma avaliação, comparando os meios de transporte, e buscando-se assegurar a eficiência do meio utilizado através de um estudo laboratorial. O VMGAIII permite maior viabilidade bacteriana dos microrganismos, quando se trata de um processamento em cultivo bacteriano, mas, quando a avaliação é por DNA, como é o caso do PCR, todos realizam uma função eficiente.

As bactérias objeto de nossa pesquisa foram selecionadas a partir de publicações da literatura científica. Buscou-se uma microbiota semelhante à investigada nos dentes permanentes para estimular uma reflexão nas terapias

endodônticas propostas para os dentes decíduos em casos de necrose pulpar. O número de bactérias a serem avaliadas é um diferencial em nosso estudo, pois, em trabalhos envolvendo PCR, são pequenos grupos escolhidos e nosso estudo contemplou grande número, com o propósito de traçar um perfil comparativo com os trabalhos realizados em dentes permanentes.<sup>6,8,12,28</sup> Assim, 15 bactérias das mais frequentes na literatura foram selecionadas: *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromona endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Dialister pneumonsites*, *Filifactor alocis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Tanarella forsythia*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*.

O *Enterococcus faecalis*, muito associado aos insucessos endodônticos em dentes permanentes, aparece em poucas amostras de dentes decíduos, de acordo com a literatura e em nossos achados.<sup>15</sup> Avaliando dentes necrosados por cárie e a dificuldade de coleta no terço apical, acreditava-se em uma frequência alta dos *Streptococcus sanguis*, *mitis* e *mutans*, todavia não foi desta maneira. Na literatura, os trabalhos avaliando a contaminação de dentes por *S. mutans* observaram que, quanto mais próximo à polpa, menor o número destes MOs<sup>15,20</sup>, provavelmente por serem facultativos e a microbiota no interior do canal encontrar-se com uma colonização maior de anaeróbios. As mais frequentes em nosso estudo foram o *Fusobacterium nucleatum*, a *Parvimonas micra*, a *Tanarella forsythia*, a *Prevotella nigrescens* e o *Actinomyces naeslundii*. As *F. nucleatum* e as *Prevotellas* são sempre muito relacionadas em pesquisas de dentes permanentes necrosados.<sup>5,6,12</sup> Estas, mesmo quando do cultivo, eram identificadas, pois apresentam características patognomônicas para sua identificação nas placas.<sup>20</sup> Sabe-se que a associação do *F. nucleatum* e de Bacilos do Pigmento Negro, no qual as *Prevotellas* se incluem, sugerem um aumento da patogenicidade. Nosso trabalho apresentou esta associação, sendo que entre a *P. intermedia* e a *P. nigrescens*, esta última com maior frequência, o que confirma a característica clínica de nossos pacientes de apresentarem infecções endodônticas primárias, com as quais estas estão associadas. A *T. forsythia* está sendo associada à necrose de dentes decíduos, assim como a *T. denticola*. Todavia, esta segunda não apresentou frequência significativa na amostra.

Assim, descreve-se uma microbiota predominantemente de anaeróbios Gram-negativos. Ao descrever um perfil bacteriano dos dentes necrosados, percebeu-se que há causas diferentes de necroses e essa alteração pode implicar uma variação de microbiota. Uma comparação, não descrita previamente na literatura, foi realizada, considerando a causa da necrose por cárie e trauma e sua microbiota. Todavia, a grande frequência da necrose por cárie em relação ao trauma dificultou esta associação, associando-se a cárie com diferença estatística significativa à *Parvimonas micra* e a *S. mitis*, ao trauma, enquanto que seguiram tendência a associar-se a cárie a *Treponema denticola* e, ao trauma, as *S. sanguis* e a *T. forsythia*.

O estudo observou grande variação na frequência dos MOs avaliados na literatura. Existe uma variação de técnica de avaliação como cultura, PCR, e Checkerboard, de MOs avaliados, de faixa etária dos

pacientes, de meios de transporte e armazenamento e tipos de coleta. Todas as diferenças metodológicas inviabilizam a correlação com os achados na literatura. Justificam-se, pois as diferenças na frequência dos MOs. Além disso, sabe-se que a microbiota no interior do canal evolui, ou seja, inicialmente abriga um grupo de MO e, com sua evolução, passa a apresentar outra microbiota. O tempo no momento em que são coletadas as bactérias também influencia nos dados encontrados.

## CONCLUSÃO

O estudo concluiu, a partir de coletas clínicas de dentes decíduos necrosados, que a metodologia envolvida no processo de coleta e armazenamento bacteriano, como o meio de transporte, pode influenciar em nossos achados. A amostra teve uma maior frequência de bactérias anaeróbias, negativas ao teste de Gram. A causa da necrose pode influenciar na constituição da microbiota, onde a cárie associa-se a bactérias anaeróbias positivas e negativas ao teste de Gram, como *Parvimonas micra* e *Treponema denticola*, e associam-se ao trauma as bactérias facultativas e positivas ao teste de Gram, como a *Tanarella forsythia*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*.

**REFERÊNCIAS**

1. Sandalli N, Cildir S, Guler N. Clinical investigation of traumatic injuries in Yeditepe University, Turkey during the last 3 years. *Dent Traumatol* 2005; 21: 188–194.
2. Anyanechi C, Chukwuneke F. Survey of the reasons for dental extraction in eastern Nigeria. *Ann Med Health Sci Res.* 2012 2(2):129-33.
3. Cardoso M, Rocha MJC. Federal University of Santa Catarina follow-up management routine for traumatized primary teeth – part 1. *Dent Traumatol* 2004; 20: 307–313.
4. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 1999; 25 (5):413-415.
5. Moraes SR, Siqueira Jr JF, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of the Effectiveness of Bacterial Culture, 16S rDNA Directed Polymerase Chain Reaction, and Checkerboard DNA-DNA Hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in Endodontic Infections. *Journal of Endodontics* 2002; 28:86-9.
6. Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:211-215.
7. Ruvière DB, LeonardoMR, Silva LAB, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the Microbiota in Root Canals of Human Primary Teeth by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Dent Child* 2007;74:118-23.
8. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in Infections of Endodontic Origin. *Journal of Endodontics* 2003; 29 (9): 549-522.
9. Gomes BPF, 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;34:537–540.

10. Brito LCN, Teles FR, Teles RP, França EC, Ribeiro-Sobrinho AP, A. D. Haffajee, Socransky SS. Use of Multiple-Displacement Amplification and Checkerboard DNA-DNA Hybridization To Examine the Microbiota of Endodontic Infections. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(9): 3039-3049.
11. 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; 106: 443-9.
12. Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase Chain Reaction of *Phorphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in Primary Endodontic Infections. *J Endod* 2007; 33:1049-1052.
13. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A Microbiological Profile of Unexposed and Exposed Pulp Space of Primary Endodontic Infections by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Endod* 2012;38:889–893.
14. Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological Evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod Journal* 2008; 41:508-515.
15. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological Profile of Symptomatic Teeth with Primary Endodontic Infections. *J Endod*, 2008 (34); 541-545.
16. Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, Sousa-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial Profile in Primary teeth with Necrotic Pulp and Periapical Lesions. *Braz Dent J* 2006; 17(2):144-148.
17. 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* 2006;102:247-53.
18. Tavares WLF, Neves de Brito LC, Teles RP, Massara MLA, Ribeiro Sobrinho AP, Haffajee AD, Socransky SS, Teles FR. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA–DNA hybridization. *International Endodontic Journal* 2011; 44, 225–235.

19. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult norwegian patients. *J Endod* 2011; 37: 1206-1212.
20. Sousa DLS, Sousa RBRA, Pinto, DN, Moreira Neto JS, Carvalho CBM, Almeida PC. Antibacterial Effects of Chemomechanical Instrumentation and Calcium Hydroxide in Primary Teeth With Pulp Necrosis. *Pediatric Dentistry* 2011; 33:301-31.
21. Law A, Messer H, An Evidence-Based Analysis of the Antibacterial Effectiveness of Intracanal Medicaments. *Journal of Endodontics*. 2004; 30: 689-694.
22. Ito IY, Junior FM, Garcia FW, Silva P, Paula Silva LAB, 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. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2011; 21:353–360.
23. Gondim JO, Avaca-Crusca JS, Valentini SR, Zanelli C, Spolidorio DMP, Giro EMA. Effect of a calcium hydroxide/chlorhexidine paste as intracanal dressing in human primary teeth with necrotic pulp against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Paediatric Dentistry* 2012; 22.
24. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJ. A comparison between two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 375-382.
25. Van Steenberghe TJM, Petit MDA, Tjihof CJ, van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaff J. Survival in transport media of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in human subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 370-374.
26. Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 365-371.
27. Franco e Franco TCC, Amoroso P, Marin JM, Àvila FA. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque Samples from Brazilian Preschool Children by Polymerase Chain Reaction. *Braz Dent J* 2007; 18(4): 329-333
28. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *J. Med. Microbiol* 2002; 51: 443–447.

29. Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, Sousa-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial Profile in Primary teeth with Necrotic Pulp and Periapical Lesions. *Braz Dent J* 2006; 17(2):144-148.
30. Gizani S, Papaioannou W, Haffajee Ad, Kavvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2009; 19: 193-200.
31. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Pater BJ. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (4): 1407-1417.
32. Papaioannou S, Gizan S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on diferent oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 183-189.

## APÊNCIDE A

### Manual de preparo doVMGA (Viability Medium Göteborg Agar)

#### 1) Descrição

O meio de transporte VMGAIII (Viability Medium Göteborg Agar) foi descrito inicialmente por Möller (1966) e por Dahlén et al. (1993) e é preparado para suportar a sobrevivência de organismos anaeróbios sem ocorrer crescimento. É aplicado para amostras pequenas, como coletadas por pontas de papel absorvente. Se armazenado bem fechado e sem contato com o oxigênio, pode ser guardado por um longo tempo. Deve ser protegido da luz. O indicador de oxi-redução é o azul de metileno e sua função é consumir oxigênio, mantendo o meio reduzido. A solução protetora é a peptona 0,1% e a gelatina 5%. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluida acima de 30°C.

#### 2) Materiais necessários:

##### 2.1. Componentes necessários

- a) Acetato de fenilmercúrio (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. P5554 – 25 g;
- b) Glicerofosfato de sódio (Merck, Alemanha) Ref. 4168 – 25 g
- c) CaCl anidro ou CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Ecibra, Santo Amaro – SP, Brasil), Ref. 0490 – 500 g;
- d) KCl (Synth, Diadema – SP, Brasil), Ref. C1058.01.AG – 500 g;
- e) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. M1880 – 500 g;
- f) NaOH (Dinâmica, Brasil) Ref. CAS1310-73-2 cod. 1702-1 – 500 g
- g) Agar bacteriológico (Acumedia, EUA), Ref. 7178A – 500 g
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA), Ref. 214340 – 500 g

- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA), (Sigma, St. Louis, EUA) Ref. T4532 – 100 g
- j) Proteona e Thiotona
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. C4820 - 25 g
- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA), Ref. T3758 – 500 mL
- m) azul de metileno

## 2.2 Vidraria necessária:

Todos esses materiais devem estar estéreis para a realização do meio.

Proveta de 50ml	1
Proveta de 100ml	1
Recipiente de vidro para pesagem (placas de petri p)	15
Colher medidora	3
Tubo de ensaio com tampa (Ágar)	4
Garrafa P (80ml) (Ágar)	2
Garrafa de 200ml	2
Garrafa de 500ml	1
Pipeta de 10ml	1
Pipeta de 100ml	1
Pipetas de 2-20µL	1
Pipetas de 1ml	1
Funis	4
Cx de Ponteiras azuis	2
Cx de Ponteiras amarelas	2
Tubo Falcon com tampa Azul (para ajuste de pH- encher até 5ml)	10
Peixinho	2

Frascos de Eppendorffs (1,5mL) com 3 bolinhas de vidro (Glass beads). A quantidade de Eppendorffs é de acordo com o volume que será preparado do meio. Neste caso, se for preparar 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.

### **2.3 Equipamentos necessários:**

1. Autoclave
2. Manta/ chama
3. Banho-maria
4. Micoondas
5. Agitador
6. Vortex
7. Camara de Anaerobiose
8. Balão de N<sub>2</sub>
9. pHmetro

### **2.3. Preparo dos volumes de Água Destilada**

O VMGA III pode ser confeccionado em volumes finais diferentes. Quanto maior o volume mais fácil a manipulação e ajuste de pH. Os cálculos abaixo são para os volume de 500, 250 2 125mL.

Para os diferentes volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de água bidestilada.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	275 mL	137,5 mL	68,75 mL
1 frasco	150 mL*	75 mL*	37,5 mL*
1 frasco	600 mL	300 mL	150 mL
1 frasco	5 mL	2,5 mL	1,25 mL

\*Colocar um peixinho para ajudar a dissolver a gelatina

### 3) Preparo do VMGA III

No preparo desse meio de transporte algumas substâncias devem ser preparadas no **dia anterior**: o Sal Azul, a solução de Sal NaOH+KOH (ajuste do pH final).

#### 3.1. Solução de Sal Azul (estoque)

Para confecção de uma solução de 100mL

##### Solução 1

1. Água destilada Estéril	30mL
2. Acetato de Fenilmercúrio	0,05g

Dissolver em banho-maria durante a noite a 56°C overnight (18horas)

##### Solução 2

1. Água destilada estéril	20mL
2. Glicerofosfato de Sódio	10g

Dissolver aquecendo levemente na Manta (dentro da câmara de fluxo) e deixar overnight.

##### Solução 3

1. Água destilada estéril	30mL
2. Cloreto de cálcio hidratado (CaCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O)*	0,16g
3. Cloreto de potássio (KCl)	0,42g

4. Cloreto de Sódio (NaCl)	1,0g
5. Sulfato de Magnésio Hidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,1g

\*Pode ser o dihidratado (2H<sub>2</sub>O) utilizando 0.1074g

Mistura a solução 1, 2 e 3 bem dissolvidas e resfriadas em uma proveta graduada e adiciona água destilada estéril até completar o volume de 100mL. Adicionar 0,003g de azul de metileno. Acondiciona a solução de Sal Azul em geladeira.

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **Solução de Sal Azul**.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	50 mL	25 mL	12,5 mL

### 3.2. Solução de NaOH + KOH

Preparar a solução de NaOH e KOH (8M). Volume final de 100 mL.

Modo de preparo:

NaOH	32g
KOH	44,88g

Dissolver em 70 mL de água bidestilada. Depois de dissolvido, acrescentar água bidestilada 30 mL, até completar os 100mL. Se for menos, não tem problema. O importante é ter na solução final 100mL. Autoclavar por 20 minutos.

#### **Iniciar o Solução de VMGA III:**

**Para esse preparo, as soluções anteriores devem estar prontas para uso.**

a) **Solução A: Para os volumes de 500mL, 250mL e 125mL.**

	500mL	250mL	125mL
Água destilada estéril	275mL	137,5mL	68,75mL
Triptose	0,25g	0,125g	0,0625g
Thiotone Peptone (Proteone e Thiotone)	0,25g	0,125g	0,625g

O frasco com água bidestilada deve estar estéril no dia anterior. Dissolver com agitação e aquecimento na manta ou no microondas por 10 segundos.

**b) Solução B: Para os volumes de 500mL, 250mL e 125mL.**

	500mL	250mL	125mL
Água destilada estéril	25mL	12,5mL	6,25mL
Bacto Ágar 4%	1g	0,5g	0,25g

A água bidestilada deve estar pré-aquecida. Essa solução não pode mais ser autoclavada. Pode preparar logo no início da manhã, pois, se deixá-la à noite em banho-maria, o Agar pode solidificar.

**c) Solução C: Para os volumes de 500mL, 250mL e 125mL.**

	500mL	250mL	125mL
Água destilada estéril	150mL	75mL	37,5mL
Gelatina	25g	12,5g	6,25g

Dissolver com agitação e aquecimento (pode utilizar o peixinho). O frasco com água destilada e o peixinho já devem estar estéreis no dia anterior. Aquecer no microondas por 10 segundos + 10 segundos + 10 segundos (total de 30 segundos), observando atentamente se derrete a gelatina. Deixar em banho-maria caso não derreta tudo.

**d) Solução D (Cisteína): Para os volumes de 500mL, 250mL e 125mL.**

	500mL	250mL	125mL
Água destilada estéril	5mL	2,5mL	1,25mL
L-cisteínahidrocolrito	0,25g	0,125g	0,625g

**e) Solução E: Para os volumes de 500mL, 250mL e 125mL.**

	500mL	250mL	125mL
Ác. tioglicólico	0,25mL	0,125mL	0,0625mL
Solução de Sal Azul	50mL	25mL	12,5mL

A solução salina deve estar estéril no dia anterior. O ácido tioglicólico encontra-se no freezer e deve ser manipulado com muito cuidado, empregando luvas e máscara.

Misturar as SOLUÇÕES A + B + C em frasco de 500 mL na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar a solução de sais de estoque azul. Adicionar a solução de ácido tioglicólico (SOLUÇÃO E). Ferver a solução por cinco minutos (dependendo da quantidade total da solução, esse tempo vai variar. O importante é ferver e mudar a cor) até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de N<sub>2</sub>. Levar para a câmara de anaerobiose.

Na câmara de anaerobiose, adicionar a solução de cisteína (SOLUÇÃO D) e ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de (NaOH + KOH), adicionando de 10 em 10 microlitros. **Adicionar aos poucos, pois não tem volta.** A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

Para medir o pH, posicionar no tubo Falcon 5mL e levar ao pHmetro com o tubo fechado, abre somente para a medição, se possível posiciona o pHmetro dentro da câmara e mede a solução inteira.

**APÊNDICE B**

## Materiais necessários para realização de coletas

- 1) Brocas esféricas diamantadas estéreis
- 2) Limas manuais de Primeira e Segunda Séries (Dentsply)
- 3) Régua calibradora
- 4) Sonda reta
- 5) Colher de dentina
- 6) Lentulo
- 7) Sugador descartável
- 8) Bandejas
- 9) Placa de vidro
- 10) Arco de Young
- 11) Lençol de borracha
- 12) Solução Salina estéril
- 13) Seringas para irrigação 5 mL (para uso de solução salina)
- 14) Seringa de 3 mL (Para uso da clorexidina gel)
- 15) Agulha para irrigação ponta roxa
- 16) Clorexidina Gel 2%
- 17) Gazes estéreis
- 18) Canetas de alta rotação
- 19) Material clínico completo
- 20) Material para tratamento endodôntico completo
- 21) Material para isolamento absoluto completo

- 22) Soluções de Peróxido de Hidrogênio a 30%, hipoclorito de sódio 5,25% e tiosulfato de sódio 5% para desinfecção
- 23) Cones estéreis para a realização das coletas que devem estar em pacotes separados de 5 em 5.
- 24) Eppendorfs com VMGA III para a coleta direcionada ao PCR
- 25) Solução Tween 80 0,5% + lecitina de soja 0,7%
- 26) EDTA 17%
- 27) Pasta Calen
- 28) Coltosol
- 29) Óxido de Zinco e Eugenol
- 30) Resinas Z100

## APÊNDICE C

### PREPARO DE SOLUÇÕES PARA PCR

#### PREPARO DNTPs (Invitrogen<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil):

Acrescentar 10 uL de cada (A, T, C, G) em 360 uL de água MiliQ estéril (100mM DNTPs Set, PCR Grade / Invitrogen, Cat N° 10297117)

#### PREPARO DOS PRIMERS (Invitrogen<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil):

Quando o primer chega liofilizado, acrescentar água Mili-Q (conforme exemplo abaixo). Esse volume dependerá de cada síntese. Deve-se verificar no rótulo do tubo do primer, ou naquele documento que vem junto, o valor indicativo da quantidade de nm (canto direito abaixo da OD). Esse valor será a quantidade de água que deverá ser utilizada para diluição do primer e assim vai ficar uma concentração de 1000 pMol (essa é a solução estoque). Para preparar a solução de uso, cuja concentração requerida é de 25 pMol, faz-se necessária uma diluição 1:40, ou seja, acrescentar 1 µl de primer estoque a 39 µl de água ultra pura/miliQ estéril.

→EXEMPLO:

Solução Estoque (1000 pMol)

- Se estiver escrito no rótulo do primer “28,31 nm”

- Acrescenta “28,31 uL” de água Mili-Q estéril, agitar bem, centrifugar rapidamente apenas para concentrar o líquido no fundo do tubo e armazenar em -20°C.

Solução de Uso (25 pMol)

- Diluir 1:40 = 1ul do estoque + 39 ul de água Mili-Q estéril

$C1 \times V1 = C2 \times V2$

$1000 \times 1\text{ul} = 25 \times ?$

? = 40 (quer dizer que empregando 1 ul da solução estoque, para ter a solução final de uso a 25pMol, o volume total deve ser 40ul, então colocar 39ul de água)

- Se quiser fazer quantidade maior de primer, é só aumentar proporcionalmente.

Ex: 5 ul de estoque + 195 ul de água

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1000 \times 5 = 25 \times ?$$

? = 200 (para uma solução de uso de 200 ul, deve-se pegar 5 ul do estoque + 195 ul de água)

### DESENHO DE PRIMERS – “OLIGO PERFECT” (Invitrogen ®)

- 1) Entrar no site da pubmed.gov
- 2) No **Search** colocar **Nucleotide**
- 3) Logo embaixo, escrever o nome da bactéria, por exemplo: *F. necrophorum*
- 4) Clicar em **Buscar**
- 5) Vários artigos vão aparecer. Pegamos o que tem o sequenciamento do gene 16S da bactéria escolhida na forma (ATCC/16S)
- 6) Vai aparecer a sequência da bactéria (**devemos copiar**)
- 7) Agora, abrir o site do google.com.br
- 8) Digitar **Oligoperfect** e dentre os resultados no Google, selecionar o primeiro para abrir o programa (na página da invitrogen)
- 9) Na região **Sequence name**, colocar novamente o nome da bactéria que estamos procurando
- 10) Na região **Applicacion**, colocar **PCR detection**
- 11) Na região **Research name** colocar, por exemplo Brenda
- 12) Agora, colar a sequência escolhida no número 6. A sequência vem com números e devemos tirá-los (apagar).
- 13) Clicar em Submit
- 14) Agora vai aparecer as especificações:  
(**Primer Size: 12-20-27 / Primer TM °C 57-60-63 / Primer GC 40-50-60 / Product Size 300-500 / Experimental conditions 50-50 / Region of analysis 1-746 / Max number of primer to returns 5.**)
- 15) Clicar em **Submit**
- 16) A ordem que aparece é a que ele acha melhor (sempre aparece em duas sequências que serão o **Foward** e o **Reverse**)
- 17) Entrar novamente no **pubmed** e na parte da esquerda colocar **Blast (sequence analysis)**
- 18) Clicar em **Nucleotides blast**
- 19) Clicar em **Others**
- 20) Copiar o primer que foi encontrado no programa da **Invitrogen** e colar.
- 21) Clicar em **Show results**
- 22) Testar o **Forward** e o **Reverse** (um pode ser + e o outro -)
- 23) Preferencialmente, deve aparecer apenas a bactéria em questão no resultado do BLAST. Às vezes aparecem outras, mas se a nossa bactéria procurada estiver com identidade de 100% e as outras com menor porcentagem, também é aceitável. Se estiverem aparecendo muitas espécies diferentes (e que sejam encontradas em canal), com alta porcentagem ou se a porcentagem de identidade com a bactéria que buscamos for baixa, devemos desconsiderar a sequência e testar outra.

Para determinar a temperatura de anelamento ideal, reações de PCR contendo primers espécie-específicos (Quadro 2) foram realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (MJ96G, Biocycler, termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte. Além das amostras foram realizados os controles positivos, com o DNA genômico purificado dos microrganismos ATCC, e o negativo, com água MiliQ esterilizada.

**Quadro 1.** Dados sobre as reações e “primers” espécie - específicos utilizados para cada microrganismo investigado.

<i>Bactéria</i>	<i>Pares de Primers (5' to 3')</i>	<i>Peso</i>	<i>Ciclo</i>	<i>Ref</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Forward: GCGCCTTTTTTGGTGTTTTTGG  Reverse: CACCCACAAACGAGGCAGGCCT G	274	Desnaturação inicial a 94°C por 1 min e 35 ciclos de : 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 90s e último passo a 72°C por 10 min.	Xia e Baumgartner, 2003
<i>Dialister pneumosintes</i>	Foward: TTC TAA GCA TCG CAT GGT GC Reverse: GAT TTC GCT TCT CTT TGT TG	1105 bp	Desnaturação a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 55°C por 1min, 72°C por 2min último passo a 72°C por 2min.	Siqueira e Roças, 2004
<i>Enterococcus faecalis</i>	Foward: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G Reverse: CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	138 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 95°C por 1min, 57°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 7min.	Sedgley et al, 2005
<i>Filifactor alocis</i>	Foward: CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG Reverse: CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG	594 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 26 ciclos de: 95°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 2min.	Siqueira e Roças, 2004
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Foward: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G Reverse: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	1000bp	Desnaturação inicial a 95°C por 5min e 30 ciclos de: 94°C por 30s, 40°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 10min.	Avilla-Campos et al, 1999
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Foward: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG Reverse: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	207bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C for 10min.	Conrads et al, 1997
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Foward: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC Reverse: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C for 10min.	Siqueira et al, 2001
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Foward: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Reverse: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 2min.	Siqueira et al, 2001
<i>Prevotella intermédia</i>	Foward: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG Reverse: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final a 72°C por 10 min.	Siqueira et al, 2001
<i>Prevotella nigrescens</i>	Foward: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG Reverse: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min and 36 ciclos de: 94°C por 30s, 58°C por 1min, 72°C por 2min e o passo final	Siqueira et al, 2001

			a 72°C por 10min.	
<i>Streptococcus mitis</i>	Forward: GTC GAA GGT GAT GAT ATG AC Reverse: GAC AGT ACG CAG TCT TAC GTC	372 bp	Desnaturação inicial a 94°C por 2min e 30 ciclos de: 94°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final de 72°C por 10 min.	Garnier et al, 1997
<i>Streptococcus mutans</i>	Forward: ATT GAA GGC GAG CCT TTA GAA AG Reverse: CTA GGA CAA TAG CAA C	351 bp	Desnaturação inicial a: 94°C por 2min e 30 ciclos de: 94°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 10min.	Garnier et al, 1997
<i>Streptococcus sanguis</i>	Forward: GTC GAT GGC GAG GAT CTA GAG C Reverse: TGC CGA GCG CTC TAA CTC CA	208 bp	Desnaturação inicial a 94°C por 2min e 30 ciclos de: 94°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 10min.	Garnier et al, 1997
<i>Tannerella forsythia</i>	Forward: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA Reverse: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 1min and 36 ciclos de: 95°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 1min e o passo final a 72°C por 2min.	Slots et al, 1995
<i>Treponema denticola</i>	Forward: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 2min e 36 ciclos de: 94°C por 30s, 60°C por 1min, 72°C por 2min, e o passo final a 72°C por 10min.	Siqueira et al, 2001
Universal 16S rDNA	Forward: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T Reverse: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466 bp	Desnaturação inicial a 95°C por 10min e 40 ciclos de: 95°C por 10s, 60°C por 10s e o passo final a 72°C for 25s	Viana et al, 2006

### EXTRAÇÃO E REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

#### Extração do DNA bacteriano

Extração de DNA foi realizada das 47 amostras coletadas dos canais radiculares de dentes decíduos.

A extração de DNA foi realizada com o QIA amp DNA kit (QYAGEN, Valencia, Califórnia, EUA, Ref. 51306 – 250 reações) de acordo com as instruções do fabricante:

1. Remover 300µL da amostra e adicionar a um eppendorf de 1,5mL.
2. Adicionar 180 µL de ATL e 20 µL de Proteinase K.
3. Agitar e incubar a 56°C por 2 horas.
4. Adicionar 200 µL de AL.
5. Agitar e incubar a 70°C por 10 min em banho seco.
6. Adicionar 200 µL de etanol puro.
7. Agitar e transferir para os tubos com filtros/colunas.
8. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
9. Transferir o filtro para o outro tubo vazio do kit.
10. Adicionar 500 µL de AW1.

11. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
12. Transferir a coluna para outro tubo.
13. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  do AW2.
14. Centrifugar a 13000 rpm por 3 min.
15. Transferir o filtro para um eppendorf normal de 1,5mL com tampa.
16. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de AE e aguardar 3 minutos.
17. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
18. Armazenar o DNA extraído a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após extração, a leitura da concentração de DNA presente nas amostras coletadas dos canais radiculares e ATCCs foi realizada a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

## REAÇÃO DE PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25  $\mu\text{L}$  de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo as quantidades especificadas no Quadro 1 para 1,5  $\mu\text{L}$  do DNA da amostra.

**Quadro 1.** Proporções dos reagentes no Master Mix para 1 amostra.

Reagentes	Quantidade ( $\mu\text{L}$ )
Tampão (10 x Reaction <i>buffer</i> Invitrogen <sup>®</sup> - Life Technology do Brasil)	2,5 $\mu\text{L}$
<i>DNTPs</i> (Invitrogen <sup>®</sup> - Life Technology do Brasil):	0,5 $\mu\text{L}$
<i>MgCl</i> <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> - Life Technology do Brasil)	1,25 $\mu\text{L}$
<i>H</i> <sub>2</sub> <i>O MiliQ</i>	18,1 $\mu\text{L}$
<i>Primer Forward</i> 100 $\mu\text{M}$ (Invitrogen <sup>®</sup> - Life Technology do Brasil)	0,25 $\mu\text{L}$

<i>Primer Reverse</i> 100µM (Invitrogen <sup>®</sup> - Life Technology do Brasil)	0,25 µL
<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen <sup>®</sup> - Life Technology do Brasil)	0,125 µL

A Taq DNA Polimerase escolhida foi a Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (Mix) da reação, evitando a necessidade de *hot start*. Em seguida, os eppendorffs iniciam o ciclo no termociclador.

## ELETROFORESE

As amostras, após a reação de PCR (produtos da amplificação), foram analisadas imediatamente por eletroforese. Foi utilizado gel de agarose a 1% (Invitrogen<sup>®</sup> - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) e corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil).

Foi incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen<sup>®</sup> - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 40 min), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) e a captura das imagens foi realizada pelo programa LISCAP Image Capture software.

### 1. PREPARO DE SOLUÇÕES PARA ELTROFORESE

- **LADDER (100bp ou 1 kb - (Invitrogen<sup>®</sup>))** Diluir 1:15
- **Brometo de etídio (10mg/ml) (Invitrogen<sup>®</sup>)** Dissolver 0,2 g de brometo de etídio em 20 ml de água destilada/MiliQ; Manter em temperatura ambiente e proteger da luz. Invitrogen já vende solução pronta.
- **Syber Safe concentrado 10000x (Invitrogen<sup>®</sup>)** É uma alternativa ao brometo. Não é cancerígeno, porém bem mais caro.
- **Taq Platinum + Buffer + MgCl<sub>2</sub>** Já vem pronto para usar, e são vendidos os três juntos
- **Loading Dye (Invitrogen<sup>®</sup>)** Também já vem pronto para uso.
- **EZ-Vision (Invitrogen<sup>®</sup>)** É semelhante ao loading, mas apresenta um component responsável pela fluorescência do DNA. Quando usamos na eletroforese não é necessário usar brometo ou Syber Safe no gel de agarose.
- **TBE 10X BUFFER (Invitrogen<sup>®</sup>)** Pegar 100 mL de TBE 10x acrescentar 900 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

### 2. REALIZAÇÃO DA ELTROFORESE

#### \* Gel Pequeno (Cuba de eletrofororese 12X12CM):

- 0,63 g de agarose (0,7%) / 0,9 g agarose (1%) / 1,8g agarose (2%)
- 90 ml de TAE 1X ou TBE 1X

2 µl de solução de brometo de etídio (10mg/ml) ou, se for usar Syber Safe colocar 9 µl (?) para 90 mL de TAE

OBS.: No gel pequeno utilizam-se dois pentes de 20 wells, considerando o primeiro well de cada pente para o ladder, e o segundo para o controle do DNA bacteriano (ATCC). É possível analisar 36 amostras.

**\* Gel Grande (Cuba de eletroforese 25X20CM):**

1 – Pesar (no copinho de café descartável) na balança de precisão de acordo com a concentração do gel (0,7%, 1% ou 2%)

2 – Misturar a agarose com 90 ml do tampão (TAE ou TBE) em Becker e aquecer em microondas até ficar transparente (+- 1min: deixar um pouco, tirar para mexer e voltar para o microondas, até desaparecerem as partículas)

3 – Passar conteúdo para o Becker contaminado com brometo e acrescentar 2uL do brometo de etídio.

*(bancada de baixo é contaminada. Na de cima não deve haver nada que ficou em contato com brometo)*

4 – Misturar e verter na bandeja.

*Importante:* Encaixar bem as borrachas para vedar as extremidades e colocar o pente.

5 – Observar se há bolhas para remover e esperar esfriar/endurecer (+-30 min).

6 – Remover as borrachas e pentes.

7 – Levar a bandeja com o gel para dentro da cuba e acrescentar tampão, se necessário, até cobrir todo gel.

*Importante:* o tampão da cuba deve ser o mesmo usado no gel (TAE ou TBE)

8 – Aplicar 4 ul da amostra + 2 ul do corante (loading dye) em cada poço.

Essa mistura é feita em um pedaço de parafilm, e não dentro do eppendorf.

9 – Fechar cuba e ligar fonte de eletroforese

+/- 90 V / +/-40 minutos. Observar no visual a posição do corante para ter noção de onde a banda está (se quiser acelerar corrida, aumentar voltagem).

Obs: Quando se vai fazer purificação a partir da banda, deve-se fazer receita dobrada (brometo tb é 2x) para os poços ficarem maiores. No gel 2% o brometo não dobra.

OBS.: No gel Grande utilizam-se três pentes de 40 wells, considerando o primeiro well de cada pente para o ladder, e o segundo para o controle do DNA bacteriano (ATCC). É possível analisar 114 amostras.

**APÊNDICE D****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

**Título da pesquisa – Avaliação da efetividade do Hidróxido de Cálcio e da associação do Hidróxido de Cálcio com a Clorexidina a 2% como medicação intra-canal de dentes decíduos necrosados após trauma**

**Pesquisador responsável –** Rebecca Bastos Rocha Araújo

**Cargo –** Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**Objetivos –** Avaliar a efetividade do Hidróxido de Cálcio e da associação do Hidróxido de Cálcio com a Clorexidina a 2% como medicação intra-canal, no tratamento endodôntico de dentes decíduos necrosados após trauma.

**Procedimentos –** os procedimentos clínicos desta pesquisa serão os seguintes:

- Realização de radiografia inicial.
- Anestesia local infiltrativa, abertura do dente para tratamento de canal. Nesse trabalho será utilizada medicação intra-canal, além de coleta de material biológico para realização de estudos microbiológicos. Os possíveis desconfortos sofridos com este trabalho são os mesmos que ocorrem durante o tratamento de canal de dentes em crianças, que são os seguintes:

- Ficar deitado de boca aberta por um período de mais ou menos 40 minutos;
- Sentir o dente “mexer” durante a realização do tratamento;
- Sentir desconforto durante a realização da radiografia, pois o filme encosta na gengiva.

Com a participação de seu filho na pesquisa, poderá se descobrir uma maneira melhor de se removerem as bactérias do canal de dentes de leite. Seu filho receberá o tratamento de todos os dentes cariados e receberá aplicação tópica de flúor e limpeza, bem com orientação sobre higiene bucal e dieta.

Após ter sido informado de forma clara e detalhada sobre a importância, procedimentos e objetivos da realização desta pesquisa e estando de acordo, venho, por meio deste instrumento de autorização por mim assinado, dar pleno consentimento aos pesquisadores para realização do tratamento e as coletas necessárias, para fins de pesquisa e divulgação. Recebi informações sobre os procedimentos realizados, possíveis riscos e desconfortos bem como os benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento sem que isto traga qualquer prejuízo ao menor. O pesquisador certificou-me de que as informações por mim concebidas terão caráter confidencial. Ressalta-se que a participação na pesquisa é voluntária, não acarretando nenhuma remuneração e/ ou indenização ao paciente. Este documento será impresso em duas vias, onde uma ficará com o paciente ou responsável e a outra com o profissional responsável pela pesquisa. Caso necessite de outros esclarecimentos quanto aos meus direitos como participante deste estudo, posso entrar em contato com:

Rebecca Bastos Rocha Araújo no telefone 3264-5063 ou no endereço R. Joaquim Nabuco 1889/400 Cep – 60125-120.

Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – Tel.: (85) 3366-8338.

**DECLARO QUE APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONCORDO EM PARTICIPAR DO PRESENTE PROTOCOLO DE PESQUISA SENDO EU O RESPONSÁVEL LEGAL.**

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Assinatura ou digital do voluntário

Nome e assinatura do (s) responsável (eis)  
pelo estudo

Assinatura ou digital do responsável legal

## APÊNDICE E



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem  
Centro de Traumatismo Buco-Dentário

### FICHA CLÍNICA

Nome: \_\_\_\_\_ ( ) F ( ) M

Responsável: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### História médica

1- Está atualmente sob cuidados médicos?  Sim  Não

Em caso afirmativo, por quê? \_\_\_\_\_

2- Possui alguma dessas alterações sistêmicas?

anemia  diabetes  leucemia  hemofilia

alterações hormonais  hepatite ou outro problema de fígado

distúrbio renal  alteração cardíaca  epilepsia, desmaio ou convulsão

Outros: \_\_\_\_\_

3- Toma algum medicamento diariamente?  Sim  Não

Em caso afirmativo, qual? \_\_\_\_\_

4- Quando foi a última vez que utilizou um antibiótico? \_\_\_\_\_

5- Tem alergia a alguma substância ou medicamento?  Sim  Não

Em caso afirmativo, qual? \_\_\_\_\_

6- Lesões dentárias anteriores  Sim  Não Quando? \_\_\_\_\_

### Outras observações

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fortaleza, \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura ou digital do responsável pelo voluntário

### Exame Clínico

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
			55	54	53	52	51	61	62	63	64	65			
			85	84	83	82	81	71	72	73	74	75			
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

### Considerações sobre o tratamento

Dente tratado: \_\_\_\_\_  
 Numero de canais: \_\_\_\_\_  
 Causa da Necrose ( ) Cárie ( ) Trauma  
 Condição do Canal ( ) Aberto ( ) Fechado  
 Condição para diagnóstico: ( ) Fístula ( ) Escurecimento  
 ( ) Espessamento radicular ( ) Dor  
 Início do Tratamento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.  
 Sessão: ( ) Única ( ) Multipla  
 Material de Irrigação: \_\_\_\_\_  
 Medicação intracanal: ( ) Ca(OH)<sub>2</sub> ( ) Ca(OH)<sub>2</sub> + CLHX \_\_\_\_%  
 ( ) Outros \_\_\_\_\_  
 Lima Inicial # \_\_\_\_ Lima Final PQM # \_\_\_\_ Lima Coleta após PQM \_\_\_\_  
 Cumprimento de trabalho: \_\_\_\_\_  
 Cones de Papel (número)  
 1ª Coleta \_\_\_\_\_ 2ª Coleta \_\_\_\_\_ 3ª Coleta \_\_\_\_\_  
 4ª Coleta \_\_\_\_\_ 5ª Coleta \_\_\_\_\_  
 Material restaurador provisório \_\_\_\_\_  
 Lentulo para colocação do material ( ) Sim ( ) Não  
 Material Obturador: \_\_\_\_\_  
 Meio de armazenamento do material bacteriano: ( ) TE ( ) VMGA

### Atendimento

DATA	PROCEDIMENTO	PRÓXIMA CONSULTA	ASS. RESPONSÁVEL

### RADIOGRAFIAS

Inicial	Final

## Controles

1 mês	3 meses
Con trol es	 <p data-bbox="730 786 933 819">Universidade Federal do Ceará Comitê de Ética em Pesquisa</p>
6 meses	<p data-bbox="480 871 1214 898">Of. Nº 233/10 Fortaleza, 01 de outubro de 2010</p> <p data-bbox="480 898 794 920"><b>Protocolo COMEPE nº 224/10</b></p> <p data-bbox="480 920 1075 947"><b>Pesquisador responsável:</b> Rebecca Bastos Rocha Araújo</p> <p data-bbox="480 947 1222 1025"><b>Título do Projeto:</b> “Avaliação da efetividade do hidróxido de cálcio e da associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina a 2% como medicação intra-canal de dentes decíduos necrosados após trauma”</p> <p data-bbox="480 1055 1222 1205">Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 30 de setembro de 2010.</p> <p data-bbox="480 1205 1222 1256">Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.</p> <p data-bbox="778 1285 948 1310">Atenciosamente,</p>

*Mirian Parente Monteiro*

Dra. Mirian Parente Monteiro  
Coordenadora Adjunta do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFC

AN  
EX  
O A

