

SAMIRA SALOMÃO LEMOS

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EM DENTES
DECÍDUOS COM NECROSE PULPAR POR MEIO DA
TÉCNICA DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (*FISH*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Almeida Ribeiro – C. D., Me., Dr^a.

Co-orientadora: Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar – Lic., Me., Dr^a.

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Salomão Lemos, Samira.

Identificação e quantificação de bactérias em dentes decíduos com necrose pulpar por meio da técnica da hibridização in situ fluorescente (FISH) / Samira Salomão Lemos. -- 2014.

87 f. : il.

Orientadora: Rosângela Almeida Ribeiro

Coorientadora: Dionéia Evangelista Cesar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2014.

1. Dente decíduo. . 2. Bactérias. . 3. Cavidade pulpar.
4. Infecção.. 5. Hibridização In Situ Fluorescente. . I.
Almeida Ribeiro, Rosângela , orient. II. Evangelista Cesar,
Dionéia, coorient. III. Título.

Samira Salomão Lemos

Identificação e quantificação de bactérias em dentes decíduos com necrose pulpar por meio da técnica da hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em _____ de _____ de 20____.

Profa. Dra. Rosangela Almeida Ribeiro – UFJF

Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar – UFJF

Prof. Dr. Celso Neiva Campos – UFJF

Profa. Dra. Fernanda Campos Machado – Faculdade Estácio de Sá

DEDICATÓRIA

Essa dissertação eu dedico a todas as crianças, seus pais e / ou responsáveis que abraçaram meu estudo junto comigo tornando meu sonho real e que me cativaram e cativam com sua pureza, amor e sinceridade, sentimentos puros e únicos das crianças, que tornam a vida mais alegre e bonita.

"Eu fico com a pureza das respostas das crianças:

É a vida! É bonita e é bonita!

Viver e não ter a vergonha de ser feliz,

Cantar,

A beleza de ser um eterno aprendiz

Eu sei

Que a vida devia ser bem melhor e será,

Mas isso não impede que eu repita:

É bonita, é bonita e é bonita!

E a vida? E a vida o que é, diga lá, meu irmão?

Ela é a batida de um coração?

Ela é uma doce ilusão?

Mas e a vida? Ela é maravilha ou é sofrimento?

Ela é alegria ou lamento?

O que é? O que é, meu irmão?

Há quem fale que a vida da gente é um nada no mundo,

É uma gota, é um tempo

Que nem dá um segundo,

Há quem fale que é um divino mistério profundo,

É o sopro do criador numa atitude repleta de amor.

Você diz que é luta e prazer,

Ele diz que a vida é viver,

Ela diz que melhor é morrer

Pois amada não é, e o verbo é sofrer.

Eu só sei que confio na moça

E na moça eu ponho a força da fé,

Somos nós que fazemos a vida

Como der, ou puder, ou quiser,

Sempre desejada por mais que esteja errada,

Ninguém quer a morte, só saúde e sorte,

E a pergunta roda, e a cabeça agita.

Fico com a pureza das respostas das crianças:

É a vida! É bonita e é bonita!

É a vida! É bonita e é bonita!

(Gonzaguinha)

*Aos meus pais, Luiz e Ana, grandes
alicerces de todos os meus sonhos; pessoas
iluminadas que guiam meu caminho.
Sem vocês nada disso seria possível.
Amo vocês!*

*Ao meu irmão Fábio, que mesmo de
longe está sempre muito perto, me dando
força, carinho e amor para que eu possa
alcançar meus ideais. Pela sua
amizade, respeito e carinho.*

*Ao meu grande amor, João Daniel,
que é acima de tudo um anjo em minha.
Por sua admiração, companheirismo,
ajuda e amor incondicional. Por me
apoiar e acima de tudo acreditar em meus
sonhos e por isso eles poderem se tornar
reais. Te amo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus* por guiar meus passos e iluminar meu caminho, me dando sempre força, coragem e perseverança para continuar minha caminhada.

À *Profa. Rosângela* que junto comigo tornou meu sonho real, me apoiando e me dando chance de realizar meu estudo, me orientando, me ensinando e pela oportunidade de continuar ao seu lado aprendendo sempre um pouco mais sobre a Odontopediatria. Deixo aqui minha enorme admiração e gratidão por você, um exemplo de profissionalismo e competência.

À *Profa. Cristina* que me dá força, carinho, amor e muitos ensinamentos; o que tornou esse projeto possível.

À *Profa. Dionéia* que abraçou meu estudo o tornando real. Pela sua paciência, ensinamentos e dedicação. Por me ensinar calmamente o “mundo” dos micro-organismos, a técnica de *FISH* e ideais de vida.

Ao *Prof. Luiz Cláudio* que abraçou meu estudo e principalmente eu como um pai e um anjo, me dando calma, tranquilidade e paciência nas análises estatísticas e nos ensinamentos transmitidos.

À *Profa. Graça*, pela conversa amiga de sempre, pelos ensinamentos e pelas oportunidades proporcionadas durante o exercício da função de Coordenadora do Programa.

Ao *Prof. Celso* por toda sua contribuição no desenvolvimento deste estudo e com meu conhecimento na área da Endodontia. Professor, te admiro muito como profissional, pessoa e mestre.

À *Fernanda*, que além de professora se tornou uma amiga; por toda sua ajuda, torcida, apoio, carinho, e disponibilidade em participar da banca examinadora do estudo.

Ao *Professor Antônio Marcio* e à *Professora Cristiane*, pela disponibilidade em ajudar sempre e aceitarem compor a banca examinadora estudo.

Ao *Alessandro* por toda sua paciência, ensinamentos e colaboração nas horas de laboratório no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/*Campus* Juiz de Fora (IFET).

Aos *professores do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica* pelos ensinamentos compartilhados.

À amiga *Stefânia*, por fazer do meu sonho seu sonho também. Pela sua amizade, carinho, amor e respeito. Pelo seu apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada. Com certeza sem você esse estudo não seria completo e possível.

À amiga *Camila C.* pelo seu carinho, alegria, paz e ajuda de sempre; obrigada mesmo por todas as ajudas, conversas e ensinamentos compartilhados.

A toda *minha família*, principalmente à minha madrinha, *Tia Rosa e ao Tio Rafael* que sempre acreditaram em meus sonhos, fazendo assim com que eles se tornassem reais, muito obrigada por todo amor, carinho, apoio e cumplicidade.

À minha cunhadinha querida, *Natália*, por toda força, carinho, amor e amizade. Te amo muito!

A *toda família Maximiano*, que sempre me apoiou e deu força e amor em minha caminhada e em meus projetos. Em especial à minha princesinha *Luísa* que me impulsiona a estudar cada vez mais, neste momento de sua vida, sobre Pediatria e que me dá força através de sua força para levar à frente meus ideais.

Às amigas *Thainara, Camila F., Priscila e Vanessa* grandes presentes do mestrado em minha vida, pessoas que me acolheram e me ajudaram sempre. Obrigada pela amizade, carinho, amor e respeito.

A todas as minhas amigas, especialmente *Daniela, Lívia, Samira, Isabele U., Izabelle M. e Naira* por me darem forças, carinho e amor; tornando assim minha caminhada mais alegre, iluminada e possível.

À amiga-irmã *Janine* por estar sempre me dando amor, carinho, paz, força e alegria, tornando assim minha vida iluminada.

A *todos meus "baixinhos" pacientes e seus responsáveis* que alegrem e dão sentido a toda minha caminhada profissional. São vocês que me dão força e coragem para seguir em frente.

Aos colegas do *Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica* por todo companheirismos, experiências e aprendizados compartilhados.

À *Vanessa*, amiga e secretária do *Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica*, por seu empenho e dedicação ao Mestrado e aos alunos, sempre disposta e pronta a ajudar no que fosse possível, com uma alegria peculiar.

Aos professores e amigos do *Departamento de Odontologia Social e Infantil* pelo incentivo, pelo exemplo e pelos momentos e ensinamentos compartilhados.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pela concessão de bolsa.

Deixo aqui o meu muito obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação como pessoa, profissional e pesquisadora.

EPÍGRAFE

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”

Augusto Cury

RESUMO

Diferentes métodos de identificação têm mostrado que a comunidade microbiana em infecções endodônticas apresenta uma grande diversidade. No entanto, o conhecimento dos perfis microbianos de infecções endodônticas em dentes decíduos ainda é limitado. Portanto, este estudo teve como objetivos avaliar qualitativa e quantitativamente a presença de micro-organismos orais em amostras de canais radiculares dentes decíduos com necrose pulpar, e verificar a correlação entre eles e sua associação com sinais e sintomas clínicos e radiográficos. Um total de 31 crianças, de quatro a dez anos (idade média = $6,29 \pm 1,27$ anos), foi incluído neste estudo. A presença de 12 patógenos selecionados (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) em 31 canais radiculares de 31 dentes com necrose pulpar foi avaliada por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*), que identificou e quantificou os micro-organismos. Medidas descritivas foram usadas para descrever os dados relativos à densidade (cél/mL X 10^8) obtida para cada micro-organismo testado. O teste de correlação de Pearson avaliou a correlação entre os micro-organismos identificados e o teste *t* de Student verificou a associação entre os sinais e sintomas clínicos e radiográficos e os micro-organismos detectados. Adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os patógenos testados foram identificados em todas as amostras. O somatório das densidades médias totais de todas as espécies bacterianas testadas e do gênero *Streptococcus* representou 80,57% da comunidade microbiana total. Os resultados do teste *t* de Student demonstraram que houve uma diferença significativa ($p = 0,02$) entre no número médio das densidades observadas na espécie *T. denticola* no grupo com presença de dor e o grupo com ausência de dor. Também foram observadas diferenças significantes no número médio das densidades da espécie *P. nigrescens* e presença de edema e *P. nigrescens* e ausência de edema; assim como para o gênero *Streptococcus* e presença de edema e *Streptococcus* e ausência de edema ($p = 0,04$; $p = 0,04$, respectivamente). A técnica de *FISH* confirmou a característica polimicrobiana da infecção endodôntica em dentes decíduos com a presença de bactérias anaeróbicas obrigatórias e anaeróbicas facultativas e do gênero estreptococos.

Palavras-chave: Dente decíduo. Bactérias. Cavidade pulpar. Infecção. Hibridização *In Situ* Fluorescente.

ABSTRACT

Different microbial identification methods have shown that the microbial community in endodontic infections presents a great diversity. However, the knowledge of the microbial profiles of endodontic infections in primary teeth is still limited. Therefore, the aim of this study was to evaluate, qualitative and quantitatively, the presence of oral microorganisms in samples from root canals primary teeth, to assess the correlations among them, and to determine their association with clinical and radiographic signs and symptoms. A total of 31 children, 4 to 10 years old (mean age = 6.29 ± 1.27 years old), was involved in this study. The presence of 12 selected pathogens (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in 31 infected root canals from 31 primary teeth with pulp necrosis was studied by using the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique which identified and quantified the microorganisms. Descriptive measures were used to present the data related to the density ($\text{cel/mL} \times 10^8$) for each microorganism tested. The Pearson correlation test assessed the correlation among the microorganisms identified and the Student *t* test assessed the association between the clinical and radiographic signs and symptoms and the pathogens detected. The significance level was set at 5% ($p < 0.05$). All the tested pathogens were detected in all samples. The total sum of the mean densities of all the bacteria species and *Streptococcus* genus represented 80.57% of the entire microbial community. The results of Student's *t* test showed that there was a significant difference ($p = 0.02$) between the average number of densities observed in the species *T. denticola* in the group with pain and the group with no pain. Significant differences were also observed in the average number densities of the species *P. nigrescens* and presence of edema and *P. nigrescens* and no edema; and for *Streptococcus* and genus *Streptococcus* and edema and no edema ($p = 0.04$, $p = 0.04$, respectively). The FISH technique confirmed the polymicrobial characteristic of the endodontic infection in primary teeth with the presence of obligate and facultative anaerobic bacteria and of *Streptococcus* genus.

Key words: Tooth, Deciduous. Bacteria. Dental Pulp Cavity. Infection. In Situ Hybridization, Fluorescence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Características das sondas (oligonucleotídeos marcados com Cy3 – Operon Technologies®) utilizadas para a identificação dos micro-organismos.	50
Quadro 2.	Fluxograma do estudo piloto para definição dos métodos de coleta e de processamento das amostras.	52
Quadro 3.	Resultado do estudo piloto para definição dos métodos de coleta e de processamento das amostras.	54
Figura 1.	Distribuição dos sinais e sintomas clínicos e radiográficos (dor, edema, fístula, radioluscência e reabsorção radicular patológica) analisados nos dentes multirradiculares das crianças incluídas neste estudo (n = 31)	55
Figura 2.	Distribuição das densidades médias totais (cél/mL X 10 ⁸) dos 12 micro-organismos testados em 31 amostras de canais radiculares com necrose pulpar.	59
Figura 3.	Distribuição em porcentagem das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados e identificados e não identificados em relação à comunidade microbiana total canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar para cada amostra (n = 31).	60
Figura 4.	Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável dor avaliada para cada amostra (n = 31).	61
Figura 5.	Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável edema avaliada para cada amostra (n = 31).	61
Figura 6.	Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável fístula avaliada para cada amostra (n = 31).	62
Figura 7.	Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável radioluscência avaliada para cada amostra (n = 31).	62
Figura 8.	Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável reabsorção radicular patológica avaliada para cada amostra (n = 31)	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Medidas descritivas (média, mediana e desvio-padrão, valores mínimo e máximo) da densidade de bactérias (cél/ml X 10⁸) na polpa necrosada (n = 31) 56
- Tabela 2.** Coeficiente de correlação de Pearson entre os micro-organismos testados nas amostras de canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar (n = 31) 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPD	<i>American Academy of Pediatric Dentistry</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>A. israelii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>A. odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
C	Celsius
C. D.	Cirurgião(ã)-dentista
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. ochracea</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
Cél	Célula
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Comprimento de trabalho
Cy3	Indo-carbocianina
Cy5	Indodicarbo-cianina
DAPI	4',6-diamino 2-fenil-indol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr ^a .	Doutora
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. alocis</i>	<i>Filifactor alocis</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FO	Faculdade de Odontologia
<i>G. morbilorum</i>	<i>Gemella morbilorum</i>
H ₂ O ₂	Água oxigenada
IFET	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
K	Kerr

Lic.	Licenciada
M	Molar
MDA	Amplificação de deslocamento múltiplo
Me.	Mestre
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
Me.	Mestre
µL	Microlitro
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaClO	Hipoclorito de sódio
N	Newtons
<i>N. mucosa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
Ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>P. denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>P. tanneriae</i>	<i>Prevotella tanneriae</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
RPM	Rotações por minuto
SCR	Sistema de canais radiculares
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
<i>S. albus</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

T. forsythia

TCLE

T. denticola

T. socranskii

Tris

UFC

UFJF

ZOE

Tanerella forsythia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Treponema denticola

Treponema socranskii

Hidroximetilaminometano

Unidade formadora de colônia

Universidade Federal de Juiz de Fora

Óxido de zinco e eugenol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
®	Marca registrada
+	Mais
n	Tamanho da amostra
-	Menos
°	Graus
X	Vezez
p	Nível de significância
r	Coeficiente de correlação
>	Maior
±	Mais ou menos
<	Menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	23
2.1	MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS	23
2.2	TÉCNICA DA HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (<i>FISH</i>)	40
3	PROPOSIÇÃO	44
4	METODOLOGIA	45
4.1	TIPO DE ESTUDO	45
4.2	ASPECTOS ÉTICO-LEGAIS	45
4.3	CASUÍSTICA	45
4.3.1	Seleção da Amostra	45
4.3.1.1	Critérios de inclusão	46
4.3.1.2	Critérios de exclusão	46
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.4.1	Dados de Identificação	47
4.4.2	Identificação e Quantificação de Micro-organismos no Sistema de Canais Radiculares	47
4.4.2.1	Coleta das amostras	47
4.4.2.2	Análise laboratorial	49
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4.6	ESTUDO PILOTO	52
5	RESULTADOS	55
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	71
8	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES	79
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	79
	APÊNDICE B – Ficha de Avaliação Clínica e Radiográfica	81

ANEXOS	82
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	82
ANEXO B – Ficha da Disciplina Odontopediatria	84

1 INTRODUÇÃO

Embora a educação em saúde e a prevenção sejam prioridades na Odontologia contemporânea, as alterações pulpares em dentes decíduos são ainda frequentes. Infecções endodônticas, sintomáticas ou assintomáticas, são causadas pela presença de micro-organismos na cavidade pulpar (COGULU et al., 2008). A contaminação da polpa por micro-organismos pode ocorrer por via direta (cárie dentária, túbulos dentinários e fraturas), por contiguidade (contaminação por região vizinha, por via linfática ou retrógrada), ou pela via hematogênica (KAKEHASHI; STANLEY e FITZGERALD, 1965).

As infecções pulpares de dentes decíduos estão relacionadas com a incursão bacteriana e sua multiplicação na câmara pulpar e canais radiculares. Dependendo da virulência e do número de micro-organismos presentes nos canais radiculares, a inflamação aguda ou crônica pode ser estabelecida na região periapical. Em dentes decíduos infectados, as lesões normalmente se desenvolvem na área de bifurcação das raízes, ao invés de se localizarem na região dos ápices, o que pode estar relacionado à elevada frequência de canais acessórios na região de furca (GOMES et al., 2013; TOYOSHIMA et al., 1988).

A necrose pulpar em dentes decíduos pode levar a uma lesão periapical capaz de afetar o germe do dente permanente em desenvolvimento. A partir do reconhecimento do importante papel desempenhado por bactérias na patogênese das infecções pulpares e periapicais, a eliminação da infecção endodôntica tornou-se o objetivo do tratamento de dentes com polpa necrosada e lesões periapicais (da SILVA et al., 2006; MARSCH e LARGENT, 1967). Além disso, o sucesso do tratamento está diretamente relacionado com a diminuição do número de micro-organismos no sistema de canais radiculares (SCR) (GAJAN et al., 2009). Desta forma, o conhecimento da diversidade microbiana presente nos canais radiculares de dentes decíduos tem extrema importância para possibilitar o desenvolvimento de terapias mais eficazes (TAVARES et al., 2011).

Em uma perspectiva ecológica, todas as espécies em uma comunidade mista devem ser detectadas e identificadas, uma vez que algumas espécies

bacterianas com baixa incidência podem se tornar dominantes em resposta às mudanças nas condições que favorecem o seu crescimento (FABRIS et al., 2014; SIQUEIRA JÚNIOR e RÔÇAS, 2009; SOGIN et al., 2006). Porém, o conhecimento a respeito da microbiota da infecção endodôntica de dentes decíduos ainda é limitado.

Estudos pioneiros sobre a etiologia das infecções endodônticas de dentes decíduos demonstraram a presença de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas (COHEN, JORESS e CALISTI, 1960; MARSH e LARGENT, 1967). As técnicas de cultivo para bactérias anaeróbicas demonstraram que as infecções endodônticas são polimicrobianas (da SILVA et al., 2006; PAZELLI et al., 2003; TOYOSHIMA et al., 1988). Entretanto, a diversidade de bactérias em qualquer ambiente é quase sempre subestimada quando avaliada por técnicas de cultura.

Os métodos moleculares vêm sendo utilizados para a detecção de micro-organismos em canais radiculares de dentes decíduos, pois permitem a identificação de espécies não identificadas por métodos de cultura, assim como permitem que as espécies sejam identificadas diretamente da amostra clínica, isto é, sem a necessidade de cultivo (COGULU et al., 2008; ITO et al., 2011; SATO et al., 1993). Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização DNA-DNA, estão sendo utilizados para identificação de espécies bacterianas difíceis de serem cultivadas, como as bactérias dos gêneros *Tannerella*, *Treponema*, *Prevotella* e *Porphyromonas* (ITO et al., 2011). O nível de detecção da técnica de hibridização DNA-DNA situa-se entre 10^4 e 10^7 células bacterianas de uma determinada espécie em cada amostra (TAVARES et al., 2011). No entanto, o conteúdo bacteriano de amostras de infecções endodônticas pode estar abaixo deste limite de detecção.

A técnica da hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) pode elevar os limites de detecção e parece não ter sido ainda utilizada na investigação da microbiota de dentes decíduos com infecção endodôntica. A técnica de *FISH* permite a visualização, a identificação e a contagem das células microbianas individualmente, sendo considerada uma técnica rápida e objetiva para a quantificação direta de micro-organismos (GMÜR e THUNHEER, 2002; MOTER e GÖBEL, 2000).

Frente ao exposto, idealizou-se o presente estudo com o objetivo avaliar qualitativa e quantitativamente os micro-organismos presentes nos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar, com ou sem inflamação periapical ou interradicular, por meio da técnica de *FISH*.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Esta seção revisará a literatura acerca dos aspectos relacionados à microbiota dos canais radiculares de dentes decíduos, assim como abordará, na segunda subseção, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) para sua melhor compreensão.

2.1 MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS

Cohen, Jores e Calisti (1960) realizaram um estudo para determinar a microbiota de dentes decíduos infectados de trinta crianças com idade entre quatro e oito anos por meio de culturas obtidas pela inserção de algodão estéril na câmara pulpar por aproximadamente 1 minuto. Todos os dentes decíduos examinados no estudo apresentavam evidências radiográficas de infecção e em sete casos havia fístula. Das trinta culturas, 21 (70%) apresentaram crescimento de *Streptococcus salivarius* e em sete (23%) foram observados *Staphylococcus albus*. Bacilos entéricos Gram-negativos foram observados em cinco culturas, das quais três foram diferenciadas como *Escherichia coli*, uma como *Aerobacter* e a outra como uma espécie de *Alcaligenes*. Foram encontrados ainda: *Streptococcus* beta hemolíticos em cinco culturas (17%); *Lactobacillus* em quatro (13%); *Streptococcus mitis* em três (10%); *Staphylococcus aureus* em duas (5%); e *Neisseria saprofita* em uma cultura (3%). Assim, os autores puderam constatar que o *S. salivarius* foi o micro-organismo mais frequentemente isolado dos dentes decíduos infectados e que apesar de fazerem parte da microbiota normal da boca, eles têm sido apontados como potenciais agentes etiológicos da cárie dentária. A incidência apresentou-se muito mais elevada neste estudo em dentes decíduos do que na maioria dos estudos anteriores realizados em dentes permanentes. O *S. albus*, conhecido por ser um habitante saprófita da cavidade bucal, incapaz de produzir doença, foi o segundo micro-organismo mais frequentemente isolado. Os bacilos entéricos Gram-negativos foram associados com a má higiene bucal e à gengivite.

Marsh e Largent (1967) determinaram as bactérias presentes no tecido pulpar de 22 molares decíduos infectados. Para que as amostras bacteriológicas fossem coletadas, os dentes foram isolados com dique de borracha e limpos com solução de cloreto de Zepheran a uma concentração de 1:1.000. Após a remoção do tecido cariado com curetas e instrumentos rotatórios, as amostras foram coletadas com cones de papel estéreis e inoculadas em diversos meios de cultura. Os micro-organismos encontrados com mais frequência foram *Streptococcus alpha* (50%), *Streptococcus gama* (41%), *Diphtheroides* anaeróbicos (36%), cocos anaeróbicos (36%), *S. albus* (27%) e *Streptococcus beta* (18%). Nenhum dos 22 molares decíduos analisados apresentou menos de dois e mais de cinco tipos de micro-organismos colonizadores do tecido pulpar.

Sato et al. (1993) realizaram um estudo com o objetivo de investigar as bactérias predominantes nas polpas necróticas de dentes humanos recém-extraídos usando, para este fim, uma câmara anaeróbica para recuperação máxima de bactérias anaeróbicas obrigatórias. Os participantes selecionados para o estudo tinham entre três e nove anos de idade e todos os dentes tinham extração indicada. Foram utilizados seis dentes decíduos humanos com lesões de origem endodôntica. Imediatamente após a exodontia, o dente teve o ápice selado com cera e depois foi transferido para uma câmara anaeróbica, onde foi dividido no sentido axial para o tecido pulpar infectado ser coletado. As amostras foram diluídas e incubadas em câmara anaeróbica e também em ar. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e analisadas. As colônias formadas a partir das placas incubadas anaerobicamente foram selecionadas para mais análises. Os autores encontraram os seguintes resultados entre as 276 cepas isoladas: 251 cepas eram anaeróbios obrigatórios (91%); 22 cepas eram facultativos (8%); e três cepas (1%) foram perdidas antes que seus requisitos atmosféricos pudessem ser testados. Os gêneros predominantes dentre os micro-organismos anaeróbios obrigatórios isolados foram: *Peptostreptococcus* (25%); *Propionibacterium* (19%); *Eubacterium* (17%); e *Fusobacterium* (13%). Outros anaeróbios obrigatórios menos isolados foram: *Bifidobacterium* (2%); *Lactobacillus* (1%); *Actinomyces* (1%); *Veillonella* (0,07%); *Porphyromonas* (0,04%); e *Prevotella* (0,04%). Foi observado também um predomínio de bastonetes Gram-positivos (51%) e de cocos Gram-positivos (25%). Os autores confirmaram os achados de estudos anteriores em relação às cepas de *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e

Lactobacillus, que também foram encontradas em amostras isoladas a partir de polpas necrosadas de dentes decíduos. Afirmaram, ainda, que a microbiota presente em polpa necrosada de dentes decíduos apresenta-se semelhante à apresentada em camadas mais profundas de lesões de dentina de dentes permanentes.

Pazelli et al. (2003) avaliaram o perfil bacteriano em canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical por meio de cultura bacteriológica. Para este propósito, selecionaram 15 crianças de ambos os sexos com idade entre três e sete anos. Entre as crianças selecionadas, obteve-se um total de 31 canais radiculares de 18 dentes decíduos com necrose pulpar e áreas radiolúcidas visíveis radiograficamente na região da furca e/ou região periapical, sugestivas de lesão periapical crônica. Todos os dentes eram passíveis de serem isolados e restaurados e também possuíam raízes intactas ou com menos de 2/3 de reabsorção radicular fisiológica, não apresentavam bolsa periodontal e nenhuma intervenção endodôntica anterior. Foi realizada a antissepsia da cavidade bucal com 5 mL de digluconato de clorexidina 0,12% durante 1 minuto seguida de anestesia local e isolamento absoluto. Posteriormente, realizou-se a antissepsia com digluconato de clorexidina 1% do campo operatório e coletou-se a amostra dos canais radiculares com cone de papel absorvente estéril, após a realização da cirurgia de acesso. Foram utilizados de três a quatro cones de papel absorvente estéreis, compatíveis com o diâmetro do canal radicular. O comprimento utilizado foi de 2 a 3 mm aquém do ápice radiográfico ou limite de reabsorção fisiológica, o qual foi determinado pela radiografia inicial. Os cones de papel ficaram no interior do canal por aproximadamente 1 minuto e depois foram transferidos para um tubo de ensaio com 2 mL de fluido de transporte reduzido para posterior análise microbiológica. Após a coleta das amostras, os canais foram tratados para a neutralização do conteúdo séptico-necrótico com limas tipo K e irrigação com NaClO 2,5% e preenchidos com pasta Calen[®]. A câmara pulpar foi selada com óxido de zinco e eugenol (ZOE). Após um período de 14 a trinta dias, o curativo intracanal foi removido e os canais foram preenchidos com pasta Calen[®] espessada com óxido de zinco e os dentes foram restaurados. As amostras foram misturadas, diluídas e semeadas. As placas foram incubadas em anaerobiose e, após a incubação, as colônias foram contadas com uma lupa. Os autores puderam observar os seguintes resultados: presença de micro-organismos anaeróbicos em trinta canais (96,8%); bacilos produtores de pigmento preto em 11 canais (35,5%); micro-organismos

aeróbicos em 29 canais (93,5%); *Streptococcus* em trinta canais (96,8%); e *Streptococcus mutans* em 15 canais (48,4%). Os resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores que mostraram que em canais radiculares de dentes decíduos com lesão periapical ocorre uma infecção polimicrobiana, com predomínio de micro-organismos anaeróbios, semelhantes aos da microbiota de dentes permanentes. Os autores afirmaram que as bactérias do gênero *Streptococcus* são também prevalentes em dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical. Os diferentes resultados obtidos nos estudos quanto à prevalência de *S. mutans* pode ser explicada pela possibilidade de exposição à cavidade bucal de alguns canais, o que aumentaria a sua presença. Na opinião dos autores, não é aceitável a falta de estudos *in vitro* e *in vivo* para se avaliar a microbiota de canais radiculares nos dentes decíduos, devido à importância dos micro-organismos na etiologia das infecções pulpares e das alterações periapicais.

Gomes et al. (2004) tiveram o objetivo de identificar os micro-organismos mais isolados dos canais com infecção endodôntica primária e secundária e a associação das espécies com os sinais e sintomas endodônticos. Foram selecionados sessenta pacientes que necessitavam de tratamento ou retratamento endodôntico. Dos pacientes incluídos no estudo, 41 apresentavam dentes com polpa necrosada e 19 já tinham tratado o canal há mais de quatro anos, porém mostravam evidências radiográficas de periodontite apical. Foram excluídos do estudo pacientes que utilizaram antibióticos nos últimos três meses ou que apresentavam alguma doença sistêmica. Os dados coletados de cada paciente para serem correlacionados com a presença de micro-organismos foram: idade; sexo; qual o dente e estado da polpa; e sinais sintomas clínicos (tipo da dor, histórico da dor, dor à palpação, sensibilidade à percussão, mobilidade, presença de secreção, presença de edema dos tecidos periodontais, presença de bolsas periodontais, histórico de terapia antibiótica ou outro medicamento relevante e exudato purulento ou hemorrágico). Sob isolamento, foi realizada a desinfecção com peróxido de hidrogênio 30% seguido de hipoclorito de sódio 2,5% e inativação com tiosulfato de sódio 5%. Conseguiu-se inicialmente a patência do canal com o mínimo de instrumentos possíveis e sem usar nenhum irrigante químico ativo. Quando foi necessário irrigar, utilizou-se solução salina estéril. Para a coleta microbiológica, foram introduzidos cones de papel estéreis no comprimento total do dente (determinado pela radiografia inicial) e estes permaneceram no canal por 60 segundos. As amostras foram

analisadas por meio de métodos de cultura. Os autores observaram 56 diferentes espécies e 21 diferentes gêneros entre as sessenta amostras. Das bactérias isoladas, 70% eram anaeróbicas ou microaerófilas. Dentre os micro-organismos anaeróbicos mais frequentemente isolados encontraram-se: *P. intermedia* e *P. nigrescens* (16,7%); *F. nucleatum* (11,7%); *P. gingivalis* (6,7%). Um gênero bacteriano frequentemente recuperado do canal radicular foi o *Streptococcus* com uma frequência de 53,3%. As espécies predominantes nas infecções primárias foram: *P. intermedia*; *P. nigrescens*; *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. A espécie predominante nos tratamentos endodônticos sem sucesso (infecção secundária) foi *Enterococcus faecalis*. A espécie *Prevotella denticola* foi encontrada em proporções iguais em infecções primárias e secundárias. Os autores encontraram também relação entre anaeróbios, especialmente Gram-negativos, e a presença ou a história de dor anterior, sensibilidade à percussão e edema. Foram encontradas as seguintes associações: dor e *P. intermedia* e *P. nigrescens*; sensibilidade à percussão e *Porphyromonas spp.*; edema e *Porphyromonas spp.*; exudato purulento e *Porphyromonas spp.*, e infecção secundária e *E. faecalis* e *Streptococcus spp.*

Faria et al. (2005) avaliaram, por meio de cultura bacteriológica, a ação antibacteriana do preparo biomecânico e da pasta Calen[®] como curativo entre sessões de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesões periapicais. O estudo incluiu 26 crianças com idade entre três e sete anos, com boa saúde geral e que não utilizaram antibióticos nos últimos três meses. Os 26 dentes decíduos selecionados apresentavam polpa necrótica e área radiolúcida visível na região de furca e/ou região periapical, permitiam o isolamento absoluto e possuíam 2/3 de raiz preservados. Foram realizados os passos de antisepsia da cavidade bucal com bochecho de digluconato de clorexidina 0,12%, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, remoção do tecido cariado, desinfecção da área, e complementação do acesso. A coleta da primeira amostra foi realizada introduzindo-se, sequencialmente, quatro cones de papel absorvente estéreis, de calibre compatível com o diâmetro do canal radicular. Cada cone de papel permaneceu no canal por 30 segundos e depois foram transferidos para um tubo de ensaio com fluido de transporte para serem processados microbiologicamente. Nos molares superiores, a amostra foi coletada no canal palatino, e nos molares inferiores, a amostra foi coletada no canal distal. Em seguida à coleta, foi realizado o preparo químico-mecânico com limas tipo K e hipoclorito de sódio 2,5%. No final do

procedimento, os canais foram secos e uma bolinha de algodão estéril foi colocada na embocadura dos canais e o dente foi selado com Cimpat[®] e ZOE. Após 72 horas, uma segunda amostra bacteriológica foi coletada, tal como o procedimento descrito para a primeira coleta. O canal foi então irrigado com 1,8 mL de solução salina estéril, e seco posteriormente. Aplicou-se EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que foi agitado por 3 minutos. Em seguida, o canal foi novamente irrigado, com 1,8 mL de solução salina estéril, e seco com cones de papel, e, então preenchido com a pasta Calen[®], como curativo de demora por trinta dias. Decorrido o período de acompanhamento, o curativo de demora foi removido por solução salina, e os canais foram secos e uma bolinha de algodão estéril foi colocada na embocadura dos mesmos e o dente selado com Cimpat[®] e ZOE novamente. Após as 72 horas em que os canais permaneceram vazios, foi coletada a terceira amostra bacteriológica da mesma forma que a primeira e a segunda amostras coletadas. Os canais foram obturados com pasta Calen[®] espessada com óxido de zinco e os dentes foram restaurados. Dos 26 canais inicialmente selecionados, vinte amostras mantiveram-se até o final do experimento. A perda de seis amostras deveu-se à falta do paciente às consultas de retorno ou à perda do vedamento coronário. Foram obtidos os seguintes resultados: micro-organismos anaeróbicos foram encontrados em todos os canais (100% dos casos); bacilos produtores de pigmento preto foram encontrados em seis casos (30%); micro-organismos aeróbios foram encontrados em 12 canais (60%); *Streptococcus* foram encontrados em 17 canais (85%); *S. mutans* foram encontrados em seis canais (30%); e bacilos aeróbios Gram-negativos foram encontrados em três canais (15%). A comparação por meio do teste de Wilcoxon demonstrou que o preparo biomecânico foi eficaz na eliminação dos micro-organismos dos canais radiculares em 20% dos casos e o curativo de demora em 62,5%, enquanto que a ação cumulativa do preparo biomecânico e do curativo de demora eliminou os micro-organismos em 70% dos casos. Pôde-se concluir que o preparo biomecânico isoladamente, apresentou resultados microbiologicamente inferiores àqueles obtidos quando o mesmo foi associado ao curativo de demora, sugerindo, assim, a necessidade de aplicação tópica de um curativo de demora entre sessões, em dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical.

da Silva et al. (2006) investigaram a prevalência dos micro-organismos em canais de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical por meio da técnica de cultura. A amostra consistiu em vinte crianças com idade entre três e sete

anos, de ambos os sexos, com boa saúde geral, e que não tinham usado antibiótico nos últimos três meses. Da amostra, foram selecionados vinte dentes decíduos, sendo sete incisivos superiores, oito molares inferiores e cinco molares superiores, todos com necrose pulpar ou com área radiolúcida visível radiograficamente na região de furca ou na região periapical, e ainda apresentando raízes intactas ou com menos de 2/3 de reabsorção fisiológica, sem bolsa e sem intervenção endodôntica prévia. Foram realizados os procedimentos de antissepsia da cavidade bucal com digluconato de clorexidina 0,12%, anestesia local, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, remoção de tecido cariado, desinfecção da área de acesso aos canais e acesso. A coleta das amostras foi realizada por meio da introdução sequencial de quatro cones de papel absorvente estéreis, de tamanho compatível com o canal radicular, os quais permaneceram por 30 segundos no interior do canal e depois foram transferidos para um tubo contendo 2 mL de fluido de transporte. Nos molares superiores, as amostras foram coletadas do canal palatino; nos molares inferiores, as amostras foram coletadas do canal distal. Após a coleta, os canais foram tratados para a neutralização do conteúdo séptico necrótico com limas *K-file* e irrigados com hipoclorito de sódio 2,5%. A pasta Calen[®] foi utilizada como curativo e o selamento foi feito com ZOE por um período de 14 a trinta dias. Depois deste tempo, o selamento provisório foi removido e o canal obturado com pasta Calen[®] espessada com óxido de zinco para, então, o dente ser restaurado. Foram observados os seguintes resultados: micro-organismos anaeróbios foram encontrados em 100% das amostras; bacilos produtores de pigmento preto foram encontrados em seis casos (30%); micro-organismos aeróbios foram encontrados em 12 amostras (60%); *S. mutans* foram encontrados em seis canais (30%), sendo que em uma amostra foi encontrada a associação *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus* e somente *S. mutans* em cinco amostras; e aeróbios Gram-negativos estavam presentes em três amostras. Os autores afirmaram que todos os canais examinados apresentavam uma infecção polimicrobiana, na qual os micro-organismos anaeróbios foram os mais prevalentes. Na opinião dos pesquisadores, micro-organismos CO₂-dependentes, microaeróbios, *Streptococcus* e ainda os aeróbios e os facultativos preparam o ambiente para a instalação dos anaeróbios levando à instalação de um ambiente de baixo potencial redox. Esse decréscimo gradual da tensão de oxigênio em canais radiculares, juntamente com as necessidades nutricionais dos micro-organismos e da cadeia alimentar atuam como

se levassem à ocorrência da seleção natural e o conseqüente predomínio dos micro-organismos anaeróbicos em dentes com necrose pulpar e lesão periapical.

Ruvière et al. (2007), em um estudo *in vivo*, avaliaram a prevalência de micro-organismos nos canais radiculares de dentes decíduos humanos, por meio da técnica de hibridização DNA-DNA. A amostra incluiu 55 canais radiculares de dentes decíduos com pulpite irreversível (grupo 1) e 51 canais de dentes com necrose pulpar e periodontite apical (grupo 2). Para as análises microbiológicas, foram usadas 34 sondas de DNA. Os resultados mostraram que as espécies mais prevalentes no grupo 1 foram: *Campylobacter rectus* (87%); *Gemella morbilorum* (78%); *Streptococcus gordonii* (71%); *Capnocytophaga ochracea* (69%); *T. denticola* (58%); e *Streptococcus intermedius* (49%). No grupo 2, as espécies mais prevalentes foram: *C. rectus* (90%); *T. denticola* (88%); *S. intermedius* (77%); *G. morbilorum* (73%); *Streptococcus oralis* (67%); *C. ochracea* (63%); *S. gordonii* (55%); *Streptococcus mitis* (51%); e *Leptotrichia buccalis* (51%). Exceto pelas bactérias *Peptostreptococcus micros* e *Actinomyces israelii*, as espécies bacterianas mais prevalentes nos canais radiculares com periodontite apical foram aquelas encontradas em maior número ($p < 0,05$). O teste *U* de Mann-Whitney demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com respeito ao número total de células bacterianas detectadas nas amostras dos canais radiculares ($p < 0,05$). O grupo 2 mostrou um número acentuadamente maior de células bacterianas.

Cogulu et al. (2008) avaliaram a presença de agentes patogênicos em amostras selecionadas a partir de canais de dentes decíduos e permanentes por meio da PCR e determinaram a associação desses micro-organismos com sintomas clínicos. A amostra foi composta por 145 crianças e adolescentes com idade entre cinco e 13 anos, que não tivessem utilizado antibióticos nos últimos três meses e sem doença sistêmica. Foram incluídos os dentes que não apresentavam bolsa periodontal maior que 4 mm e que podiam ser isolados e restaurados após o tratamento. Foram analisadas e armazenadas as seguintes características clínicas para posterior verificação de associação com os micro-organismos encontrados: idade; sexo; *status* do dente e *status* pulpar; e os sinais e sintomas clínicos (histórico da dor, dor espontânea, sensibilidade à percussão, dor à palpação, mobilidade, presença de edema, canal úmido, odor e radiolucidez periapical). Dos 145 participantes selecionados, obteve-se uma amostra de 79 dentes decíduos e 66 molares permanentes. Todos os casos incluídos no estudo foram categorizados da

seguinte forma: grupo 1 (n = 42 dentes; vinte decíduos e 22 permanentes), representado por pacientes que apresentavam periodontite apical aguda, com sintomas clínicos agudos (dor ao mastigar, sensibilidade à percussão ou à palpação e edema) e falta de evidência radiográfica; grupo 2 (n = 63 dentes; 35 decíduos e 28 permanentes), representado por pacientes com periodontite apical crônica, com presença de radiolucidez periapical e sem nenhum outro sintoma clínico nos três meses anteriores ao tratamento; e grupo 3 (n = 40 dentes; 24 decíduos e 16 permanentes), que incluiu pacientes com periodontite apical grave ou exacerbada e presença concomitante de radioluscência e de um ou mais sintomas clínicos. Foram realizados os procedimentos de limpeza da coroa com pedra-pomes e colocação do isolamento absoluto. Dente e campo foram, então, lavados com peróxido de hidrogênio 3% e descontaminados com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, inativada em seguida com tiosulfato de sódio 5%, e posterior acesso aos canais. As amostras foram coletadas da seguinte forma: uma lima tipo K número 15 foi utilizada para agitar o conteúdo do canal; em seguida, outra lima foi introduzida no canal por 60 segundos, a 1 mm aquém do ápice radiográfico, e movimentos suaves de limagem foram realizados; dois cones de papel estéreis foram inseridos sequencialmente no mesmo nível para absorver o fluido do canal e cada um permaneceu no interior do mesmo por 60 segundos. Nos casos em que o canal apresentava-se seco, foi colocada uma pequena quantidade de solução salina estéril para aquisição de amostra viável. As limas e os cones foram transferidos para microtubos com fluido de transporte. Todas as amostras foram processadas dentro de 2 horas e depois congeladas e armazenadas até serem analisadas pela PCR. Em cada um dos casos, mesmo em dentes multirradiculares, um único canal serviu de amostra sendo escolhido para coleta o canal radicular que apresentasse radioluscência ou lesão, ou o canal de maior calibre, ou seja, nos molares superiores, selecionou-se o canal palatino, e nos molares inferiores, selecionou-se o canal distal. Os autores realizaram os ensaios de PCR para os seguintes micro-organismos: *Actinomyces israeli*; *Candida albicans*; *E. faecalis*; *F. nucleatum*; *P. endodontalis*; *P. gingivalis*; *P. intermedia*; *Streptococcus intermedius*, *T. denticola*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythensis*; *Enterococcus faecium*; *Prevotella melaninogenica*. Nos dentes permanentes, as espécies mais prevalentes foram: *E. faecalis* (13 amostras; 20% dos casos); e *P. gingivalis* e *T. denticola*, ambas presentes em 32% dos casos (48 amostras). As espécies mais prevalentes nos

dentes decíduos foram: *P. gingivalis* e *T. denticola*, ambas presentes em 16% dos casos (13 amostras). A necrose pulpar foi associada aos micro-organismos *E. faecalis* e *T. denticola*. Os micro-organismos *A. israelii* e *E. faecium* não foram detectados nos dentes decíduos nem nos permanentes. Os autores puderam demonstrar com seus resultados que os micro-organismos *T. denticola* e *E. faecalis* foram altamente associados à lesão periapical e à dor anterior; *P. gingivalis* foi associado à dor à percussão em dentes decíduos e permanentes; e, ainda, que *P. melaninogenica* foi associada à dor espontânea em dentes permanentes. Em conclusão, o estudo demonstrou que certas espécies de micro-organismos estão associadas com sinais e sintomas das doenças endodônticas tanto nos dentes permanentes como nos dentes decíduos.

Tannure et al. (2009) realizaram um estudo com o objetivo de identificar os prováveis fatores associados com o insucesso da pulpectomia de dentes decíduos a partir da análise qualitativa por histopatologia e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Realizou-se uma avaliação clínica longitudinal do sucesso de pulpectomia realizada em 66 crianças, com idade entre três e oito anos, que não apresentavam comprometimento sistêmico e que apresentavam inflamação irreversível ou necrose pulpar em consequência de uma lesão cariiosa. Foram excluídos do estudo dentes que apresentavam suporte ósseo inadequado e excessiva reabsorção radicular patológica. A amostra incluiu um total de cento e trinta dentes tratados pela instrumentação com limas K, irrigação com hipoclorito 2,5% e solução salina, obturados com pasta de ZOE, e restaurados com resina composta. Os pacientes retornaram para avaliação clínico-radiográfica em intervalo de três meses e foram acompanhados por um tempo médio de 33 meses (de 18 a 48 meses). As avaliações determinaram falha do tratamento em 18 dentes e estes foram, então, extraídos. O critério de Strindberg's para dentes permanentes foi utilizado para avaliar o fracasso ou não do tratamento, o qual analisa a persistência clínica dos sinais ou sintomas (dor, edema); desenvolvimento de drenagem do trato sinusal; e aumento, não-alteração, ou aparecimento de novas reinfecções perirradiculares. Apenas oito dos dentes extraídos apresentavam as raízes suficientemente intactas para serem selecionadas aleatoriamente para análise histopatológica ou por MEV. Para a análise histopatológica foram utilizados quatro dentes decíduos extraídos, sendo dois incisivos e dois molares; para a MEV foram também utilizados quatro dentes decíduos extraídos, sendo dois incisivos e dois

molares. Os autores chegaram aos seguintes resultados na análise histopatológica: todas as amostras mostraram tecido necrosado e células de inflamação crônica persistente no canal radicular; em duas amostras, infecções bacterianas foram observadas no canal radicular; um achado comum foram áreas de reabsorção radicular externa associada à lacunas de Howship; um molar apresentou reabsorção patológica avançada; um incisivo mostrou reabsorção e áreas reparadas; e reabsorção interna inflamatória foi também observada. Na análise por MEV, foi possível observar: todos os dentes, tanto nas áreas apicais quanto nas áreas de bifurcação radicular, apresentaram-se fortemente infectados por micro-organismos, assim como as lacunas de Howship nas superfícies apicais; a morfologia dental irregular revelou áreas de reabsorção de dentina; e, em alguns casos, eritrócitos estavam associados com bactérias. Os autores puderam concluir, então, que o principal fator responsável pelo fracasso de pulpectomia em dentes decíduos são as limitações impostas pela técnica devido às irregularidades morfológicas do canal e dos dentes pela reabsorção inflamatória externa. As bactérias, o tecido necrótico e o substrato que persistem nos canais radiculares, revelados mesmo após os procedimentos de desinfecção, sugerem que, durante a pulpectomia dos dentes decíduos, deve ser dada uma adequada atenção ao preparo químico-mecânico dos mesmos e que devem ser utilizados materiais de preenchimento com comprovada eficácia antibacteriana.

Ito et al. (2011) investigaram a microbiota de canais radiculares de dentes decíduos com periodontite apical, antes e depois do curativo intracanal, por meio da técnica de cultura microbiana e pela técnica de hibridização DNA-DNA. O estudo incluiu 19 crianças, de ambos sexos, com idade entre três e sete anos, que apresentavam polpa necrótica e evidências radiográficas de perda óssea perirradicular. Foram selecionados 38 canais para a cultura e 28 canais para a técnica de hibridização DNA-DNA. Todos os dentes selecionados tinham raízes intactas ou menos de 2/3 de reabsorção radicular, não apresentavam bolsa periodontal profunda e nem intervenção endodôntica anterior. Foram excluídas do estudo crianças com doenças sistêmicas e que fizeram uso de antibiótico sistêmico e antissépticos bucais nos três meses anteriores ao estudo. Foram realizados os seguintes procedimentos: anestesia; isolamento absoluto do dente; remoção do tecido cariado; antissepsia do campo operatório e do dente com digluconato de clorexidina 1%; complementação do acesso com instrumentos rotatórios; e

introdução de uma pequena quantidade de solução salina estéril nos canais para possibilitar a coleta das amostras. As amostras bacteriológicas primeiramente foram coletadas com uma lima K 15 introduzida até 1 mm aquém do ápice radiográfico ou limite de reabsorção radicular, realizando-se um movimento discreto de vai e vem. Em seguida, dois cones de papel estéreis foram inseridos em sequência no mesmo comprimento de trabalho, por 1 minuto, para absorver o fluido do canal. Os cones de papel foram transferidos para um tubo com 2,5 mL de fluido de transporte reduzido e os canais foram limpos e modelados pela técnica de *step-back* e depois secos com cones de papel. A irrigação foi realizada com hipoclorito de sódio 2,5%, os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio com digluconato de clorexidina, e os dentes restaurados com resina composta. A medicação intracanal permaneceu por um período de 14 dias. Após este tempo, o curativo foi removido, irrigou-se o canal com solução salina, deixando-o vazio por um período de sete dias, para permitir a proliferação bacteriana dos micro-organismos residuais ao preparo químico-mecânico. Depois deste período, coletou-se a segunda amostra e realizou-se o preenchimento do canal com hidróxido de cálcio reabsorvível espessado com óxido de zinco, e restaurou-se o dente. Para os procedimentos de cultura microbiológica, foram feitas as diluições das amostras, as quais foram semeadas e incubadas. As colônias foram contadas em um estereomicroscópio sob luz refletida e foram calculadas as UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro). A hibridização DNA-DNA permitiu a detecção da presença e a quantificação relativa de 35 espécies bacterianas através de um tabuleiro de damas modificado. Os seguintes resultados foram obtidos para os meios de cultura (n = 19; 38 canais): prevalência inicial de micro-organismos anaeróbicos (94,7% das amostras); em dez amostras foram detectadas bacilos produtores de pigmento preto e *Streptococcus*; micro-organismos aeróbicos estavam presentes em 18 amostras; e na segunda amostra os mesmos micro-organismos estavam presentes, porém em quantidades drasticamente menores. Na hibridização DNA-DNA foram identificadas 31 sondas das 35 pesquisadas (16 de micro-organismos facultativos: seis de Gram-negativos e dez de Gram-positivos; e 14 de micro-organismos anaeróbicos, 11 de Gram-negativos e três de Gram-positivos). Micro-organismos aeróbicos foram encontrados em todas as amostras. Tanto na primeira coleta quanto na segunda coleta, as 13 sondas identificadas foram: quatro de micro-organismos facultativos (uma de Gram-negativo e três Gram-positivo); oito de micro-organismo anaeróbico (seis de Gram-

negativo e dois de Gram-positivo); e uma de micro-organismo aeróbico. Os autores afirmaram ainda que as espécies predominantes antes e depois da limpeza dos canais foram: *Neisseria mucosa* (em 100% dos casos), *Fusobacterium nucleatum* *sit polymorphum* (50% antes contra 42,8% após a limpeza dos canais); *P. melaninogenica* (35,7% antes contra 14,2% após a limpeza dos canais); e *Streptococcus gordonii* (em 28,5% dos casos). Os autores concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio associada à digluconato de clorexidina é eficaz na redução do número de bactérias no interior do canal radicular quando aplicada como medicação entre sessões na terapia pulpar de dentes decíduos, a fim de auxiliar o tratamento da periodontite apical.

Tavares et al. (2011) realizaram o estudo com o objetivo de combinar a técnica de MDA (Amplificação de Deslocamento Múltiplo) com a hibridização DNA-DNA para qualificar e quantificar a microbiota de infecções endodônticas em dentes decíduos. Para o estudo, foram selecionadas 35 crianças com idade entre quatro e dez anos. Todas as crianças possuíam dentes decíduos com polpa necrosada, com ou sem lesão periapical visível radiograficamente, e raízes intactas ou menos de 2/3 de reabsorção radicular fisiológica, além de o dente permitir o isolamento absoluto. Foram excluídos dentes com histórico de traumatismo, com comprometimento periodontal e com tratamento endodôntico anterior. Das 35 crianças, foram selecionados quarenta dentes, sendo 31 molares e nove unirradiculares. Nos molares, a amostra foi coletada do canal mais largo e associado à lesão. Os procedimentos clínicos realizados antes da coleta das amostras foram os seguintes: isolamento absoluto; assepsia com peróxido de hidrogênio 30% na coroa seguido de iodo 5%; inativação com tiosulfato de sódio 5%; e acesso. A coleta das amostras foi obtida por meio de raspagem na parede do canal com lima K 15, introduzida no canal com comprimento de trabalho de 1 mm aquém do ápice radiográfico ou limite de reabsorção fisiológica, determinado pela radiografia inicial. Quando ocorresse imagem radiográfica da raiz do dente decíduo sobrepondo à coroa do germe do permanente, a lima seria introduzida até o nível da cúspide do germe do dente permanente. Após a remoção da lima, os 2 mm finais da sua parte ativa foram segmentados com uma tesoura estéril e colocados em um tubo de microcentrífuga contendo solução tampão. Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo, neutralizadas e encaminhadas para a realização dos exames. A técnica de MDA foi utilizada para a amplificação de todo o genoma e o teor das amostras de DNA foi

medido antes e depois da amplificação do MDA. Para a hibridização DNA-DNA, foram utilizados mais de oitenta tipos de sondas para a detecção das espécies presentes. Os autores obtiveram os seguintes resultados: *Aggregatibacter (Haemophilus) aphrophilus* e *Helicobacter pylori* não foram detectados em nenhuma das amostras; as espécies bacterianas mais prevalentes foram: *P. intermedia*, detectada em 96,9% das amostras; *N. mucosa*, presentes em 65,2% das amostras; *P. nigrescens* e *Tanerella forsythia*, ambas detectadas em 56,2% das amostras; *P. denticola*, identificada em 53,1% das amostras; e *F. nucleatum ss vincentii*, detectada em 50% das amostras. As espécies menos detectadas foram: *E. faecalis* (3,2%) e *Eikenella corrodens* (3,1%). Em conclusão, os autores afirmaram que os canais radiculares de dentes decíduos são infectados por uma população diversa de bactérias. A classe *Prevotella spp.* foi comumente encontrada, com *P. intermedia*, *P. tanneriae* e *P. nigrescens* entre as espécies mais frequentemente detectadas.

Gomes et al. (2013) investigaram a presença de *Filifactor alocis*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *Treponema socranskii* nas câmaras pulpares e canais radiculares de dentes decíduos e compararam a prevalência destas espécies em ambos ambientes. Participaram do estudo 15 crianças de três a oito anos de idade, que apresentavam necrose pulpar em molares decíduos. Foram registradas as seguintes informações para cada paciente: idade; sexo; episódios anteriores de dor; presença de mobilidade dentária; trato sinusal; presença de edema nos tecidos periodontais; presença ou ausência de reabsorção óssea periapical/interradicular; estado dos canais radiculares durante a amostragem (seco ou molhado); e presença ou ausência de odor estranho. Foram excluídas do estudo as crianças que tivessem utilizado antibióticos nos últimos três meses ou que apresentassem doenças sistêmicas, ou ainda cujos dentes tivessem sofrido tratamento endodôntico anterior, assim como dentes com exposição da câmara pulpar na cavidade bucal e dentes com reabsorção interna. Todos os dentes envolvidos no estudo tinham raízes intactas ou menos de 1/3 de reabsorção fisiológica de raiz, permitiram o isolamento absoluto com dique de borracha, e não tinham história de trauma e envolvimento periodontal. Os dentes foram anestesiados, foi realizada uma antissepsia da cavidade bucal com digluconato de clorexidina 0,12% e foi feito isolamento absoluto. Em seguida, a superfície do dente, o isolamento absoluto, o grampo e o arco foram desinfetados com peróxido de hidrogênio 30% seguido de hipoclorito de sódio

2,5%, neutralizados por solução de tiosulfato de sódio 2,5%. O tecido cariado foi removido com instrumento rotatório estéril e o preparo foi completado com Endo-Z estéril até o acesso ser obtido. Após a desinfecção, uma amostra foi coletada com uma agulha estéril para ser analisada pela técnica de PCR. Uma bolinha de algodão estéril umedecida em solução fisiológica estéril foi colocada na câmara pulpar em contato com o assoalho da mesma por 60 segundos e, em seguida, transferida para um tubo estéril vazio. Posteriormente, três cones de papel absorvente foram colocados sequencialmente em todo o comprimento do maior canal (canal palatino dos molares superiores e canal distal dos molares inferiores), durante 60 segundos e depois transferidos para um tubo estéril. Em casos de canal seco, o cone de papel foi umedecido com solução salina estéril antes da transferência para o tubo de amostra para assegurar a viabilidade da aquisição. As amostras foram armazenadas a -80°C. Todos os dentes envolvidos no estudo foram tratados endodonticamente após a coleta da amostra. Foram utilizados iniciadores específicos para investigar as seguintes espécies: *F. alocis*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *T. socranskii*. As espécies mais frequentemente detectadas na câmara pulpar foram: *P. nigrescens* (86,7%); *P. gingivalis* (73,3%); *F. alocis* (73,3 %). Das amostras da câmara pulpar, 13,3% continham *P. micra* e *T. denticola*, e 6,7% continham *T. forsythia*. As espécies mais frequentes detectadas em amostras do canal radicular foram: *P. gingivalis* (100%); *P. nigrescens* (93,3%); *P. tanneriae*, *P. micra* e *T. denticola* (40%); *T. forsythia* (26,7%); *F. alocis* (13,3%); e *P. intermedia* (6,7%). As espécies *T. socranskii* e *P. endodontalis* não foram detectadas nas amostras da câmara pulpar ou do canal radicular. A presença simultânea de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *T. denticola* que, em conjunto, formam o "complexo vermelho", não foi encontrada na câmara pulpar de nenhum dente, mas foi encontrada no canal radicular em três casos.

Topcuoglu, Bozdogan e Kulekci (2013) avaliaram a presença de dez espécies bacterianas em amostras de canais radiculares de dentes decíduos e determinaram a sua associação com condições clínicas. As amostras foram coletadas de trinta canais de dentes decíduos com infecção primária. A composição bacteriana foi definida semi-quantitativamente pelo sistema Parocheck. Todas as espécies testadas foram detectadas nas amostras. *F. nucleatum* foi a bactéria mais frequentemente isolada (96,7%), seguida pela *P. intermedia* (86,7%), *P. micra*

(83,3%), *T. denticola* (76,7%) e *T. forsythia* (66,7%). Estas bactérias estavam presentes em altas contagens. Canais radiculares com mais de cinco espécies associaram-se significativamente com radiolusência periapical ($p = 0,049$). Em conclusão, os autores confirmaram que dentes decíduos com infecção endodôntica mostram uma grande diversidade de bactérias e que as espécies mais prevalentes estão presentes em altas proporções.

Fabris, Nakano e Avila-Campos (2014) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a presença de bactérias e seus diferentes morfotipos nos dentes decíduos com necrose pulpar e/ou fístula. Participaram do estudo 110 crianças (69 meninos e 41 meninas) de dois a 12 anos de idade, que apresentavam sinais clínicos e radiográficos de necrose pulpar e/ou fístula. Foram excluídas do estudo, crianças que utilizaram antibiótico três meses antes da coleta e/ou com doenças sistêmicas. Foram coletadas amostras de 103 crianças com polpa necrosada e de sete crianças com fístula. Para o procedimento, o dente foi isolado com dique de borracha, limpo com peróxido de hidrogênio 3%, neutralizado por NaClO 1%, e em seguida neutralizado por tiosulfato de sódio 5%. Os cones, para a coleta das amostras, foram deixados no interior do canal por 60 segundos e em seguida transferidos para um tubo contendo 250 μ L de fluido de transporte. Os morfotipos bacterianos foram visualizados pelas colorações de Gram e de Brown e Brenn, e os DNA foram obtidos e usados na detecção bacteriana por PCR. Foi observada a predominância de cocos Gram-positivos em 81,8% dos casos e cocobacilos Gram-negativos em 49,1% dos casos. O DNA bacteriano foi detectado em 88 das 103 polpas necróticas observadas e sete amostras de fístulas; nas amostras das polpas os micro-organismos predominantemente encontrados foram: *Enterococcus spp.* (50%), *P. gingivalis* (49%), *F. nucleatum* (25%) e *P. nigrescens* (11,4%). A ocorrência do *Enterococcus spp.* foi maior no meninos que nas meninas e apresentou valores estatisticamente significativos; no entanto não foram observadas diferenças significativas em relação à idade. Foram detectados em fístulas: *P. gingivalis* (43%); *Enterococcus spp.* (28,6%); *F. nucleatum* (14,3%); *P. nigrescens* (14,3%); e *Dialister pneumosintes* (14,3%). Esses resultados permitiram aos autores concluir, em concordância com estudos anteriores, que a microbiota envolvida nas infecções pulpares em dentes decíduos é similar em termos quantitativos, àquela observada em dentes permanentes. Entretanto a

predominância de *Enterococcus spp.* e *P. gingivalis* deve ser levada em consideração pelos profissionais, nos casos de terapia pulpar em dentes decíduos.

Triches et al. (2014) identificaram, por meio da hibridização DNA-DNA, a microbiota endodôntica dos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão perirradicular. O estudo incluiu oito crianças com média de idade de seis anos, com boa saúde geral e que não utilizaram antibióticos nos últimos três meses. O dente decíduo apresentava lesão de cárie profunda com envolvimento pulpar, diagnóstico de necrose pulpar (baseado em exames clínicos e radiográficos) e lesão perirradicular associada, com ou sem fístula drenando. A amostra incluiu 24 canais radiculares de oito primeiros molares dos oito pacientes. Foram realizados os passos de antissepsia da cavidade bucal com bochecho de digluconato de clorexidina 0,12%, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, remoção do tecido cariado, desinfecção da área, e complementação do acesso. A coleta da amostra foi realizada utilizando três cones de papel absorvente estéril, colocados um em cada canal, durante 1 minuto. Os cones foram transferidos para um microtubo com o fluido de transporte adequado para a técnica. Foi realizada a hibridização DNA-DNA utilizando-se quarenta sondas de DNA para a identificação das espécies microbianas. Os autores puderam observar que as espécies mais frequentes foram as seguintes: *P. melaninogenica*, *F. nucleatum sp. nucleatum* e *Fusobacterium periodonticum*, todas em 100% dos casos; *P. nigrescens* em 96% dos casos; *P. intermedia* em 92% dos casos; *G. morbillorum* e *E. faecalis* em 83% dos casos; e *P. micra* em 79% dos casos. As espécies facultativas estavam presentes em vinte canais radiculares (83% dos casos), as espécies anaeróbicas estavam presentes em 24 canais radiculares (100%) e as aeróbicas em 18 canais (75%). Os bacilos produtores de pigmento preto foram encontrados em 23 amostras (96%). Observou-se, ainda, que o número de diferentes espécies bacterianas variou entre vinte e 33, com uma média de 24,9 ($\pm 4,1$) e o número de diferentes espécies bacterianas detectadas por canal radicular variou entre cinco e 33, tendo uma média de vinte ($\pm 7,9$). Não foram observados sinais de quimioluminescência em cinco sondas (*Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii I*, *Actinomyces odontolyticus I*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a e *Propionibacterium acnes I*) das quarenta espécies pesquisadas. A ausência de quimioluminescência pode significar que as bactérias estavam presentes em uma concentração abaixo do limite de detecção do método da hibridização DNA-DNA, que identifica as espécies

começando em uma concentração de 10^5 células, ou essas bactérias estavam realmente ausentes. Este estudo corroborou resultados de estudos anteriores de que as bactérias anaeróbicas estão presentes em 100% dos canais. Algumas espécies de difícil cultivo também foram identificadas, como a *T. forsythia* e a *T. denticola*. Estes dois micro-organismos são periodontopatogênicos e integram o “complexo vermelho”, são caracterizados pela produção de importantes fatores de virulência relativos ao mecanismo de defesa do hospedeiro e ainda são relacionadas com a etiologia e a gravidade da doença periodontal em adultos. Baseados nos resultados do estudo, os autores concluíram que existe uma natureza multimicrobiana na infecção endodôntica nos canais radiculares dos dentes decíduos com necrose pulpar e lesão perirradicular, com presença de micro-organismos aeróbios, facultativos e anaeróbios, e que o método molecular utilizado demonstrou que as espécies mais predominantes são *F. nucleatum sp. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* e *P. intermedia*.

2.2 TÉCNICA DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (*FISH*)

A técnica de *FISH* foi introduzida, em 1988, por Giovannoni et al., que utilizaram sondas radioativas de oligonucleotídeos de RNAr (ácido ribonucléico ribossômico), possibilitando a detecção microscópica de bactérias. Os autores iniciaram os estudos com as sondas para detectar e quantificar os micro-organismos em populações microbianas mistas e puderam observar que as sondas apresentavam amplas aplicações para identificação microbiana em diagnósticos médicos.

DeLong, Wickham e Pace (1989) realizaram um estudo com sondas de oligonucleotídeos com marcadores fluorescentes, não radioativos, para a detecção de células bacterianas. Ao compararem as sondas radioativas, os autores observaram que as sondas fluorescentes são mais seguras, oferecem uma melhor resolução e não necessitam de passos adicionais. Observaram também que estas podem ser marcadas com corantes de diferentes comprimentos de onda, o que permite a detecção de várias sequências com uma única hibridização.

Amann et al. (1990) utilizaram sondas fluorescentes de hibridização de nucleotídeos para marcar as células bacterianas para análise por citometria de fluxo.

Moter e Göbel (2000) realizaram um estudo de revisão de literatura sobre a técnica de *FISH*. Corroboraram a ideia de que as sondas fluorescentes utilizadas nesta técnica são consideradas mais seguras, oferecem melhor resolução, não necessitam de passos adicionais e podem ser marcadas com corantes de diferentes comprimentos de onda, o que permite a detecção de várias sequências com uma única hibridização. Os corantes marcadores utilizados são derivados fluorescentes, como o Cy3 e o Cy5, que são superiores por promover coloração mais brilhante e serem estáveis à fotodegradação. Os autores também discutiram as vantagens da técnica de *FISH* sobre as técnicas de cultura de micro-organismos e sobre outras técnicas moleculares, como a PCR. Os autores relataram que as técnicas de cultura são muito demoradas, seletivas e não refletem a composição exata de comunidades bacterianas mistas ou a diversidade microbiana em infecções. Existem outras técnicas moleculares, como a PCR, que podem ser usadas com sucesso na microbiologia clínica para detectar micro-organismos de crescimento lento ou de difícil cultivo, porém estas não fornecem informações sobre a morfologia, o número e a distribuição espacial dos mesmos. A técnica de *FISH* tornou possível combinar a precisão da genética molecular com a informação visual da microscopia, e possibilita, simultaneamente, a visualização, identificação, enumeração e localização dos micro-organismos tanto em seu *habitat* natural como em tecidos doentes, tornando-se útil para a descrição de análises da microbiota habitual e de infecções microbianas mistas na cavidade bucal. Os autores apresentaram os seguintes passos da técnica: (1) fixação da amostra; (2) preparo da amostra; (3) hibridização com a sonda específica para detecção das respectivas sequências marcadas; (4) lavagem para remoção das sondas que não se ligaram; e (5) montagem, visualização e documentação dos resultados.

Loy et al. (2006) descreveram a existência de um banco de dados na *internet* com sondas de oligonucleotídeos de RNAr, o *probeBase*, banco de dados este desenvolvido, em 2002, com o objetivo de ajudar os pesquisadores a encontrarem sondas já desenvolvidas e publicadas, fornecendo-lhes, assim, as informações necessárias sobre a especificidade e cobertura das sondas.

Del'Duca e Cesar (2007) afirmaram que a técnica de *FISH* é uma técnica de biologia molecular que se baseia na hibridização de sondas de oligonucleotídeos,

marcadas com fluorocromos, complementares de genes-alvo específicos para a detecção de micro-organismos sem a necessidade de cultivo prévio. Os marcadores de oligonucleotídeos de RNAr são os mais utilizados, devido à propriedade conservativa deste RNA e por estar presente em todos os organismos e por poderem ser construídos com diferentes fluorocromos, sendo o Cy3 o mais utilizado. A identificação dos micro-organismos é realizada por meio da microscopia de epifluorescência, microscopia de varredura ou citometria de fluxo.

Na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), o Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos e a Faculdade de Odontologia (FO) vem desenvolvendo vários estudos com a técnica de *FISH* para avaliar a microbiota bucal de gestantes, de pacientes com síndrome de Down e, agora, de dentes com necrose pulpar.

Machado et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de testar a hipóteses das diferenças qualitativas e quantitativas dos micro-organismos *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *Campylobacter rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* por meio da técnica de *FISH* entre vinte mulheres grávidas, no segundo trimestre de gravidez e vinte mulheres não-grávidas. Para o estudo foram registrados os seguintes índices: profundidade de sondagem; sangramento à sondagem; nível clínico de inserção; e presença de cálculo. Amostras de placa subgingival foram coletadas e a técnica de *FISH* identificou a presença e o número dos micro-organismos analisados. Os parâmetros clínicos não mostraram diferenças significativas entre mulheres grávidas e não-grávidas. O estudo mostrou que os padrões de colonização das diferentes bactérias mais comumente associadas com a doença periodontal não foram diferentes na placa subgingival de mulheres grávidas e de mulheres não-grávidas. Os autores sugeriram que a ausência de diferença pode estar associada à variabilidade da amostra. Os valores máximos de *P. intermedia* foram mais de quatro vezes maior nas grávidas do que nas não-grávidas. Entretanto, estes micro-organismos não foram encontrados em algumas grávidas, mas todas as não-grávidas apresentaram indivíduos desta espécie, mesmo que em baixas densidades.

Scalioni (2013) realizou um estudo com o objetivo de avaliar a experiência de cárie dentária e a contagem de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Streptococcus* presente na saliva de crianças portadoras de síndrome de Down (grupo SD) em comparação com crianças não sindrômicas (grupo ND). O estudo incluiu trinta crianças com SD

(com idade entre três e 12 anos) e trinta crianças (com idade entre quatro e 12 anos) sem a síndrome. A técnica de *FISH* foi empregada para a identificação e quantificação dos micro-organismos presentes na saliva. As crianças do grupo SD apresentaram significativamente uma experiência da cárie dentária mais baixa ($p < 0,001$) e mais baixa contagem de *S. mutans* na saliva ($p < 0,001$), em comparação com as crianças do grupo ND. Não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa na contagem de *S. sobrinus* e *Streptococcus* presentes na saliva entre os dois grupos. As contagens de *S. mutans* e *S. sobrinus*, presentes na saliva, não puderam ser associadas a mais baixa experiência de cárie dentária observada entre as crianças do grupo SD.

Vale ressaltar que não foram encontrados estudos que utilizaram a técnica de *FISH* para a análise da microbiota de dentes decíduos com infecção endodôntica. Assim, o uso desta técnica molecular, por suas vantagens, adicionaria informações a esta importante área de tratamento da Odontopediatria, que é a mais controversa da especialidade.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propôs a avaliar qualitativa e quantitativamente micro-organismos presentes nos canais radiculares de dentes decíduos com diagnóstico de necrose pulpar com ou sem inflamação perirradicular ou interradicular.

Especificamente, este estudo se propôs a:

- Identificar e quantificar, por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*), em dentes decíduos com necrose pulpar, com ou sem inflamação peri ou intrarradicular, as seguintes espécies de bactérias: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; *Campylobacter rectus*; *Enterococcus faecalis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella intermedia*; *Prevotella nigrescens*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*; *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*; e o gênero *Streptococcus*.
- Verificar a correlação entre os micro-organismos identificados nos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar.
- Verificar a associação entre sinais e sintomas clínicos e radiográficos dos dentes decíduos com infecção endodôntica com os micro-organismos identificados nas amostras dos canais radiculares.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, de avaliação clínica e laboratorial.

4.2 ASPECTOS ÉTICO-LEGAIS

O presente estudo seguiu as normas e diretrizes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP/UFJF), em 22 de março de 2013 (Parecer nº. 226.775 – Anexo A).

Os pais e/ou responsáveis pelas crianças que atenderam aos critérios de inclusão consentiram na participação do menor no estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice A).

Todas as crianças incluídas no estudo receberam tratamento odontológico adequado.

4.3 CASUÍSTICA

4.3.1 Seleção da Amostra

A amostra foi selecionada entre crianças atendidas na disciplina Odontopediatria da Faculdade de Odontologia (FO) da UFJF, sem distinção de raça, gênero, nível socioeconômico, cujos pais e/ou responsáveis concordaram com sua participação no estudo.

4.3.1.1 Critérios de inclusão

Para ser incluída no estudo, a criança deveria atender aos critérios abaixo listados, que estão fundamentados em estudos anteriores (COGULU et al., 2008; GOMES et al., 2004; GOMES et al., 2013; ITO et al., 2011; PAZELLI et al., 2003; SATO et al., 1993; TANNURE et al., 2009; TAVARES et al. 2011):

- Concordar e permitir a realização do exame e a coleta das amostras.
- Comparecer à consulta acompanhada do pai, mãe ou seu responsável legal, para a assinatura do TCLE.
- Não apresentar comprometimento sistêmico, informado pelos pais ou responsável legal.
- Ter pelo menos um dente decíduo com diagnóstico de necrose pulpar, com ou sem inflamação perirradicular ou interradicular, sem bolsa periodontal, com indicação de tratamento (pulpectomia), com raiz(ízes) intacta(s) ou com reabsorção menor que 2/3, que permitisse isolamento absoluto do campo operatório e realização de restauração.

4.3.1.2 Critérios de exclusão

Foi excluída do estudo a criança que apresentou as condições descritas a seguir, também adotadas em estudos anteriores (COGULU et al. 2008; GAJAN et al., 2009; GOMES et al. 2004; GOMES et al., 2013; ITO et al., 2011; PAZELLI et al., SATO et al., 1993; 2003; TANNURE et al., 2009; TAVARES et al. 2011):

- Doenças sistêmicas informadas pelos pais.
- Uso de medicação antimicrobiana sistêmica nos três meses anteriores ao exame inicial.
- Dentes com bolsa periodontal.
- Dentes decíduos com diagnóstico de necrose pulpar com mais de 1/3 de reabsorção radicular, reabsorção óssea comprometendo a crista de germe do

dente permanente sucessor, com coroas irrestauráveis ou que não permitissem o isolamento absoluto do campo operatório.

- Dentes que já tivessem sido tratados endodonticamente.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Dados de Identificação

Para cada participante, foi preenchido um prontuário clínico, adotado regularmente na disciplina Odontopediatria da FO-UFJF (Anexo B), no qual foram registrados os dados de identificação e anamnese. Posteriormente, foram realizados os exames clínico e radiográfico iniciais do dente a ser tratado, para registro, em uma ficha especialmente elaborada para o estudo (Apêndice B), dos sinais e sintomas, conforme adotado em estudos anteriores (COGULU et al., 2008; GOMES et al., 2004; GOMES et al., 2013), a saber:

- Sintomatologia dolorosa: presente; ausente.
- Edema: presente; ausente.
- Fístula: presente; ausente.
- Radioluscência na região periapical ou de furca: presente; ausente.
- Reabsorção radicular patológica: presente; ausente.

4.4.2 Identificação e Quantificação de Micro-organismos nos Canais Radiculares

4.4.2.1 Coleta das amostras

A amostra para análise qualitativa e quantitativa dos micro-organismos presentes nos canais radiculares de dentes decíduos foi coletada em uma consulta

posterior à do exame clínico. Para cada criança, foi usado um dente como unidade amostral. Optou-se por esta estratégia para evitar problemas de correlação entre observações, no caso de análise de mais de um dente por indivíduo. Em dentes multirradiculares, um único canal serviu de amostra, a fim de limitar a avaliação microbiana para um único ambiente ecológico (COGULU et al., 2008). Para a seleção do canal em dentes multirradiculares, foram adotados os seguintes critérios: canal radicular que apresentasse radioluscência ou lesão; ou o canal de maior calibre, que nos molares superiores é representado pelo canal palatino e nos molares inferiores é representado pelo canal distal (COGULU et al., 2008; GOMES et al., 2005; TAVARES et al., 2011).

Inicialmente, a criança realizou bochecho com digluconato de clorexidina 0,12% (Periogard[®], Colgate-Palmolive Ind. Brasileira, Osasco, SP, Brasil), durante 1 minuto, para antissepsia da cavidade bucal; nas crianças que não conseguiram fazer o bochecho, a antissepsia foi realizada com auxílio de uma gaze estéril embebida no mesmo antisséptico. Sob anestesia local e isolamento absoluto, foi realizada a desinfecção do campo operatório com digluconato de clorexidina a 1% (Farmácia Cavaleri[®], Juiz de Fora, MG, Brasil). A remoção de todo o tecido cariado foi realizada com curetas e brocas esféricas carbide (KG Sorensen[®], Cotia, SP, Brasil), de acordo com o tamanho da cavidade, em baixa rotação, seguida de nova desinfecção do campo operatório e posterior acesso com pontas diamantadas estéreis (KG Sorensen[®], Cotia, SP, Brasil). Foi realizada irrigação com solução salina estéril nos canais que se apresentaram mais secos para que as amostras pudessem ser coletadas. Em seguida, uma lima tipo K número 15 (Maillefer[®], Ballaigues, Suíça) foi introduzida até o comprimento de trabalho, delimitado pela radiografia inicial, e estabelecido a 1 mm aquém do ápice radiográfico ou do limite de reabsorção radicular fisiológica, realizando-se movimentos suaves de limagem por 1 minuto (COUGULU et al. 2008) após sua remoção do canal, a lima foi transferida para um microtubo. O conjunto microtubo/lima foi pesado (Balança Exacta Digital Precisão PL-1200AS, Curitiba, Brasil) antes e após a coleta, como descrito no estudo piloto, para que a diferença de peso entre as duas pesagens fornecesse o peso da amostra obtida e a análise quantitativa pudesse ser realizada. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de paraformaldeído 2% para a manutenção da amostra até a análise microbiológica (COTTREL e KIRCHMAN, 2000). O risco de deglutição/aspiração pela criança foi prevenido pelo uso do dique de borracha que

serve como barreira aos materiais utilizados no procedimento operatório. Além disso, adotou-se a estratégia de amarrar os grampos, limas e cones de papel utilizados.

Após a coleta das amostras, o preparo químico-mecânico foi realizado segundo a técnica descrita por Guedes-Pinto, Paiva e Bozzola (1981), que preconiza o preparo mecânico com limas K, preparo químico com Endo-PTC (Fórmula & Ação Farmácia Magistral Ltda. – ME[®], São Paulo, Brasil) e líquido de Dakin (NaClO 0,5%; Farmácia Cavalieri[®], Juiz de Fora, MG, Brasil), irrigação final com tergentol-furacin e obturação do sistema de canais radiculares com a Pasta Guedes-Pinto (Fórmula & Ação Farmácia Magistral Ltda. – ME[®], São Paulo, Brasil), constituída por iodofórmio, paramonoclorofenol canforado e Rifocort. A câmara pulpar foi preenchida com cimento de ZOE (Pulpo-San; SS White[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o dente foi selado com cimento de ionômero de vidro autopolimerizável (Vidrion-R; SS White[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil) até a sua restauração definitiva (COGULU et al., 2008; ITO et al., 2011; PAZELLI et al., 2003; TAVARES et al., 2011).

4.4.2.2 Análise laboratorial

As amostras foram mantidas congeladas a uma temperatura de -20°C até a análise microbiológica. Cada amostra foi passada no vortex, e, em seguida o conjunto lima + paraformaldeído foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL, ao qual foram acrescentados 3 mL de água destilada filtrada, totalizando assim, 5 mL de amostra diluída no tubo. A amostra foi sonicada três vezes com intervalos de 1 minuto entre cada sonicação, e filtrada em filtro branco de policarbonato de 0,2 µm de poro.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*) foi utilizada para a identificação e a quantificação dos micro-organismos. Para tanto, foram utilizadas 12 sondas de oligonucleotídeos, 16S rRNA (Operon Technologies Inc., Alemanha, EUA), marcadas com fluorocromo Cy3 para a identificação das espécies (Quadro 1).

Quadro 1. Características das sondas (oligonucleotídeos marcados com Cy3 – Operon Technologies[®]) utilizada para a identificação dos micro-organismos.

Sonda	Especificidade	Sequência da Sonda (5'- 3')	Concentração da formamida	Referência
ACAC	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	TCCATAAGACAGA TTC'	30	SUNDE et al. (2003)
B/TAFO	<i>Tanerella forsythia</i>	CGTATCTCATTTTA TTCCCCTGTA	30	SUNDE et al. (2003)
CARE	<i>Campylobacter rectus</i>	TTAACTTATGTA AAGAAG	20	RIEP et al. (2009)
Efs129	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCCTCTGATGGG TAGGTT	35	BEHR et al. (2000)
FUS664	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	CTTG TAGTTCCG C(C/T)ACCTC	40	THURNEER; GMUR; GUGGENHEIM (2004)
MUT590	<i>Streptococcus mutans</i>	ACTCCAGACTTT CCTGAC	30	TREBESIUS et al. (2000)
Pint649	<i>Prevotella intermedia</i>	GCCGCCRCTGA ASTCAAGCC	40	GMÜR; THURNHEER (2002)
Pnig657	<i>Prevotella nigrescens</i>	TCCGCCTGCGCTG CGTGTA	40	GMÜR; THURNHEER (2002).
POGI	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CAATACTCGTATC GCCCGTTATTC	30	SUNDE et al. (2003)
TRE II	<i>Treponema denticola</i>	GCTCCTTTCTC ATTTACCTTTAT	30	MOTER et al. (1998)
SOB	<i>Streptococcus sobrinus</i>	TTAACTCCTCTT ATGCGG	40	TREBESIUS et al. (2000)
STR	<i>Streptococcus</i>	TAGCCGTCCTT TCTGGT	30	TREBESIUS et al. (2000)

A técnica de *FISH* foi realizada de acordo com o protocolo utilizado por Cottrel e Kirchman (2000). Foi utilizada, também, uma sonda de controle negativo (5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, para a avaliação da eficiência da hibridização. Os filtros foram divididos ao meio; metade foi armazenada caso fosse necessário repetir alguma análise e a outra metade foi dividida em 13 partes. Cada parte foi colocada sobre uma lâmina revestida por parafilme, e com a sonda de oligonucleotídeo na concentração final de 2,5 ng/μL, marcada com Cy3. As lâminas foram incubadas em um recipiente selado (câmara de hibridização) com a solução de hibridização e

permaneceram em estufa a 42°C por, no mínimo, 4 horas. A solução de hibridização continha 0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 duodecil de sulfato de sódio e a concentração de foramida específica de cada grupo de bactérias. Após a hibridização, a amostra foi transferida para uma solução de lavagem e corada com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) para que, assim, as células bacterianas pudessem ser contadas no procedimento seguinte.

Para a contagem das células bacterianas dez campos aleatórios foram utilizados em cada filtro com auxílio do microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse Ci equipado com os seguintes jogos de filtro: bloco de filtro U-2 A, para DAPI; e bloco de filtro C-FL CY3 HYQ, no aumento de 1000X.

O microscópio utilizado foi equipado com uma câmera digital de alta resolução e as imagens foram capturadas para ilustração. Posteriormente, essas imagens foram avaliadas como auxílio do programa *Image Tool 3.0*.

Todos os procedimentos para as análises microbiológicas foram realizados no Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos da UFJF e no Laboratório de Biologia do IFET (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/Sudeste de Minas Gerais/*Campus* Juiz de Fora).

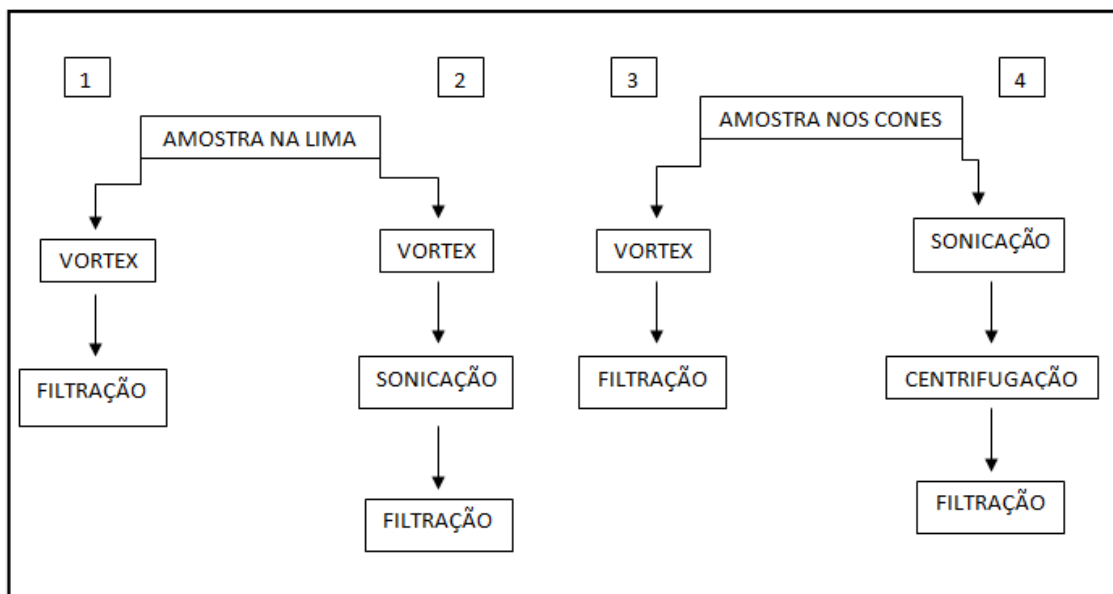
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em um banco de dados no programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences – SPSS – versão 15.0 para Windows*. Medidas descritivas (média, desvio-padrão, mediana, valores mínimo e máximo) foram usadas para descrever as variáveis contínuas, relativas à densidade (cél/mL X 10⁸) dos micro-organismos testados. O teste de correlação de Pearson avaliou a diferença estatística entre os micro-organismos identificados. O teste t de Student foi usado para verificar a diferença entre a densidade média de cada bactéria testada na presença ou na ausência dos sinais e sintomas clínicos e radiográficos avaliados (dor, edema, fistula, radioluscência na região periapical e/ou de furca, e reabsorção radicular patológica. Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.6 ESTUDO PILOTO

Antes da realização do estudo principal, realizou-se um estudo piloto com o objetivo de definir o melhor procedimento para a coleta e a obtenção das amostras. Dois métodos de coleta e quatro métodos de processamento (Quadro 2) foram testados. Três crianças, com idade entre três e dez anos, participaram desta etapa. Para os dois métodos de coleta a serem testados, os procedimentos clínicos descritos na subseção 4.2.2.1 foram obedecidos até o passo de irrigação do canal radicular com solução salina estéril.

Quadro 2. Fluxograma do estudo piloto para definição dos métodos de coleta e de processamento das amostras.



No primeiro método de coleta e processamento, utilizou-se uma lima K, que foi passada no vortex para que o material microbiológico soltasse da lima e, em seguida, a amostra foi filtrada. No segundo método de coleta e processamento, utilizou-se uma lima K, segundo os procedimentos anteriormente descritos na subseção 4.2.2.1. Para o terceiro e o quarto métodos de coleta e processamento, foi utilizada a inserção de três cones de papel absorvente, em sequência, no mesmo comprimento de trabalho, por 1 minuto. Posteriormente, os cones foram transferidos para um microtubo, e o conjunto microtubo + cones foi pesado e acrescido de

paraformaldeído 2%. O conjunto (microtubo + cones) também foi pesado antes da coleta para que a diferença entre as pesagens fornecesse o peso da amostra.

Após serem fixadas e armazenadas em paraformaldeído, as amostras na lima foram processadas de duas formas (opções denominadas de 1 e 2, para facilitar a comunicação). A opção 1 foi processada da seguinte forma: passou-se o microtubo contendo a amostra no vortex; removeu-se 0,5 mL da amostra, que foi, posteriormente, filtrado em filtro branco de policarbonato de 0,2 μm . A opção 2 foi processada da seguinte forma: passou-se o microtubo no vortex e em seguida transferiu-se todo o conteúdo do microtubo (lima + paraformaldeído) para um tubo Falcon de 15 mL, ao qual foram acrescentados 3 mL de água destilada filtrada, perfazendo um total de 5 mL de amostra diluída no tubo. A amostra foi, então, sonicada três vezes, com intervalos de 1 minuto entre cada sonicação e, depois, filtrada em filtro branco de policarbonato de 0,2 μm . As amostras de cone também foram processadas de duas formas (opções 3 e 4). A opção 3 foi realizada a partir da filtração de 0,5 mL do paraformaldeído onde os cones estavam armazenados. A opção 4 foi realizada a partir da transferência de 1,5 mL do paraformaldeído contendo a amostra para um tubo Falcon de 15 mL, completado com 3 mL de água destilada filtrada. A amostra foi sonicada conforme descrito na opção 2 e depois centrifugada em três etapas em 3000 RPM durante 5 minutos. Após a centrifugação da amostra, filtrou-se 1 mL da nova amostra centrifugada.

Para avaliar a completa liberação das bactérias da lima, a mesma foi lavada com água destilada filtrada em filtro com poro 0,2 μm e posteriormente corada com DAPI.

As lâminas obtidas em cada método testado foram analisadas ao microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse Ci equipado com o bloco de filtro U-2 A para DAPI e bloco de filtro C-FL CY3 HYQ, no aumento de 1000X.

Ao serem analisadas microscopicamente, as amostras coletadas com cones apresentaram dificuldade de visualização, pois as fibras que fazem parte da constituição do cone ficaram sobrepostas sobre os micro-organismos. Ainda ao ser analisado microscopicamente, o cone apenas filtrado apresentou um menor número de micro-organismos em relação ao cone que foi sonicado e centrifugado. Menor número de micro-organismos também foi observado microscopicamente no processamento da amostra com lima após filtração direta. Além da quantidade, a distribuição dos micro-organismos na lâmina foi usada como critério de escolha.

Tratamentos com distribuição mais homogênea foram priorizados em comparação com tratamentos onde a distribuição era agregada, com formação de aglomerados e onde havia bactérias aderidas às partículas, no caso fibras dos cones. A distribuição agregada e os aglomerados subestimam a quantificação dos micro-organismos devido a sobreposições.

Foi criada uma escala para avaliação das lâminas para a obtenção da forma de coleta que seria utilizada no estudo, conforme apresentado no Quadro 3.

Quadro 3. Resultado do estudo piloto para definição dos métodos de coleta e de processamento das amostras.

MÉTODOS DE COLETA/ PROCESSAMENTO	LÂMINA P01	LÂMINA P02	LÂMINA P03
1	+++	+++	+++
2	++++	++++	++++
3	+	+	+
4	++	++	++

Escala de visualização das lâminas ao microscópio: +++++ Lâmina com ótima visualização; +++ Lâmina com boa visualização; ++ Lâmina com visualização ruim; + Lâmina com péssima visualização.

Observou-se que a opção 2 permitiu a obtenção de lâminas mais limpas, em melhores condições de serem visualizadas e analisadas sem interferência ou artefato advindos da técnica de preparo. As lâminas obtidas com as amostras coletadas com cone apresentaram muitos artefatos que impediram uma boa visualização. Desta forma, o método adotado no estudo principal foi a opção 2.

5 RESULTADOS

No período compreendido entre janeiro de 2013 e fevereiro de 2014, 53 crianças foram examinadas. O estudo incluiu a participação final de 31 crianças (13 do gênero feminino e 18 do gênero masculino), com idade entre quatro e nove anos (média de idade = $6,29 \pm 1,27$ anos), que atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos no estudo. Todas as amostras analisadas eram de dentes multirradiculares, sendo cinco amostras de primeiros e segundos molares superiores e 26 de primeiros e segundos molares inferiores.

A Figura 1 apresenta os sinais e sintomas clínicos e radiográficos identificados nas 31 amostras de canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar. Em 77,42% (24/31) da amostra total, observou-se a presença de dor; em 29,03% (9/31), observou-se edema; em 38,71% (12/31), havia presença de fístula; em 38,71% (12/31), identificou-se radioluscência; e em 16,13% (5/31), havia reabsorção radicular patológica.

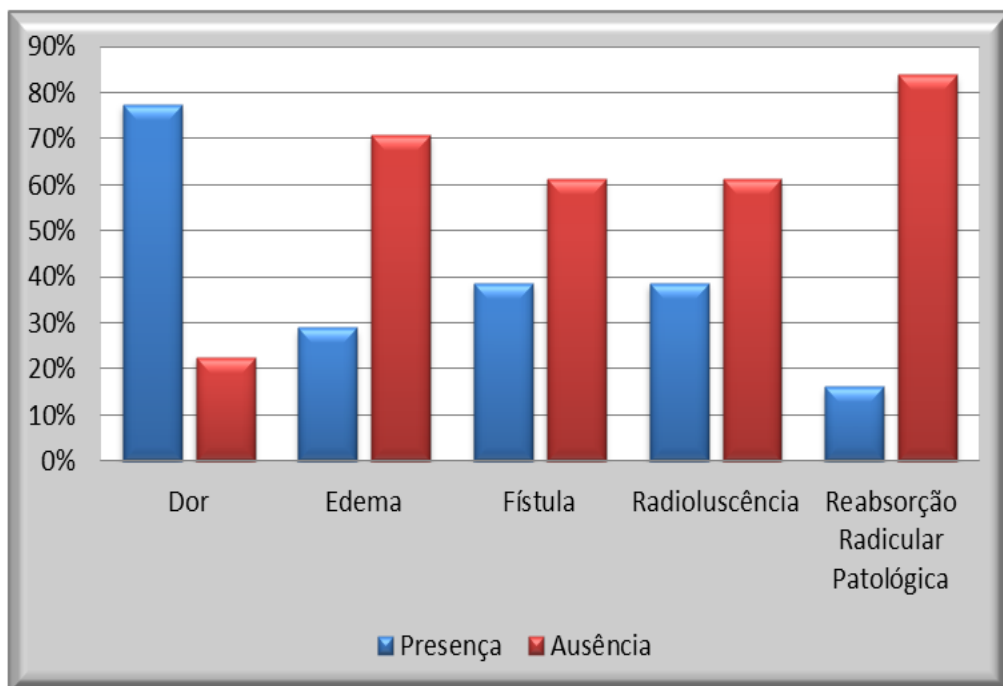


Figura 1. Distribuição dos sinais e sintomas clínicos e radiográficos (dor, edema, fístula, radioluscência e reabsorção radicular patológica) analisados nos dentes multirradiculares das crianças incluídas neste estudo (n = 31)

A Tabela 1 apresenta as medidas descritivas da densidade dos micro-organismos (cél/mL X 10⁸) identificados nas 31 amostras de dentes decíduos com necrose pulpar. Os micro-organismos testados mostraram-se presentes em todos os casos, com médias próximas de 2 cél/mL x 10⁸. A variação no número de cada micro-organismo entre as amostras foi considerada alta (coeficiente de variação acima de 30%). As exceções foram para as amostras de *C. rectus* e *P. gingivalis* com coeficientes de variação de 28 e 23%, respectivamente. O maior coeficiente de variação foi encontrado nas amostras de *A. actinomicetencomitans* (83%). O menor número de indivíduos, encontrados em todas as amostras, foi do gênero *Streptococcus* (0,13 cél/mL X 10⁸), e a maior densidade foi da espécie *F. nucleatum* (11,27 cél/mL X 10⁸).

Tabela 1. Medidas descritivas (média, desvio-padrão, mediana e valores mínimo e máximo) da densidade de micro-organismos (cél/mL X 10⁸) em dentes decíduos com necrose pulpar (n = 31)

Micro-organismo	Medidas descritivas				
	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>A. actinomicetencomitans</i>	2,46	2,04	1,82	0,52	9,76
<i>C. rectus</i>	2,74	0,78	2,73	1,08	4,84
<i>E. faecalis</i>	2,05	0,76	2,21	0,35	3,24
<i>F. nucleatum</i>	3,12	2,14	2,65	0,56	11,27
<i>P. gingivalis</i>	2,32	0,55	2,45	1,31	3,13
<i>P. intermedia</i>	2,33	0,90	2,18	0,76	5,44
<i>P. nigrescens</i>	2,59	1,55	2,42	1,15	9,70
<i>Streptococcus</i>	2,53	1,45	2,35	0,13	7,86
<i>S. mutans</i>	1,90	0,84	1,71	0,49	4,04
<i>S. sobrinus</i>	2,38	0,97	2,20	0,52	4,36
<i>T. forsythia</i>	2,40	1,07	2,16	0,62	6,01
<i>T. denticola</i>	2,82	1,33	2,39	1,24	7,23
Micro-organismos totais	36,83	8,72	37,76	20,69	56,31

A Tabela 2 apresenta as correlações das densidades médias calculadas para os 12 micro-organismos testados nas 31 amostras de dentes decíduos com necrose pulpar. Alta correlação (r entre 0,8 e 0,6) foi encontrada entre *F. nucleatum* e *P. nigrescens* ($p < 0,001$) e entre *S. mutans* e *S. sobrinus* ($p < 0,001$). A densidade de *F. nucleatum* ainda se correlacionou moderadamente (r entre 0,6 e 0,4) com a densidade de *P. intermedia* ($p = 0,022$). A densidade de *S. sobrinus* correlacionou-se significativamente com a densidade de outros seis micro-

organismos. A densidade de *E. faecalis* também se correlacionou com outras sete densidades dos micro-organismos analisados. A densidade de *Streptococcus* correlacionou-se com as duas espécies pertencentes ao gênero (*S. mutans* e *S. sobrinus*). Ambas as espécies de *Streptococcus* também se correlacionaram com as densidades de *C. rectus*, *E. faecalis* e *T. forsythia*. A densidade de *S. sobrinus* ainda se correlacionou com *P. gingivalis* e *T. denticola*. As densidades das duas espécies de *Prevotella* (*P. intermedia* e *P. nigrescens*) avaliadas também se correlacionaram moderadamente entre si ($p = 0,003$). A correlação moderada da densidade de *P. intermedia* e *T. denticola* foi extremamente significativa ($p < 0,001$). A densidade de *A. actinomicetencomitans* não se correlacionou significativamente com a densidade de nenhuma outra bactéria.

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson entre os micro-organismos testados nas amostras de dentes decíduos com necrose pulpar (n = 31)

Valores das correlações												
Micro-organismos	<i>A. actinomicetencomitans</i>	<i>C. rectus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>P. nigrescens</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>T. denticola</i>
<i>A. actinomicetencomitans</i>												
<i>C. rectus</i>	ns											
<i>E. faecalis</i>	ns	0,394*										
<i>F. nucleatum</i>	ns	ns	ns									
<i>P. gingivalis</i>	ns	ns	0,390*	ns								
<i>P. intermedia</i>	ns	ns	0,557 [†]	0,411*	Ns							
<i>P. nigrescens</i>	ns	ns	0,387*	0,724 [‡]	Ns	0,509 [†]						
<i>Streptococcus</i>	ns	0,380*	ns	ns	0,413*	ns	Ns					
<i>S. mutans</i>	ns	0,525 [†]	0,577 [†]	ns	Ns	ns	Ns	0,403*				
<i>S. sobrinus</i>	ns	0,490 [†]	0,401 [†]	ns	0,535 [†]	ns	Ns	0,391*	0,697 [‡]			
<i>T. forsythia</i>	ns	ns	ns	ns	0,372*	0,535 [†]	Ns	Ns	0,426*	0,562 [†]		
<i>T. denticola</i>	ns	ns	0,371*	ns	Ns	0,567 [‡]	Ns	Ns	ns	0,469 [†]	0,432*	

Nível de significância: * significativo (p entre 0,01 a 0,05); [†] muito significativo (p entre 0,001 a 0,01); [‡] extremamente significativo ($p < 0,001$); e ns não significativo.

A proporção média de cada um dos micro-organismos avaliados não ultrapassou 10% da média total de bactérias (coradas com DAPI) encontradas nas 31 amostras. Em média, a densidade de *S. mutans* encontrada foi a menor ($1,90 \pm 0,84 \text{ cél/mL} \times 10^8$) e a de *F. nucleatum* foi a maior ($3,12 \pm 2,14 \text{ cél/mL} \times 10^8$), o que pode ser observado na Figura 2.

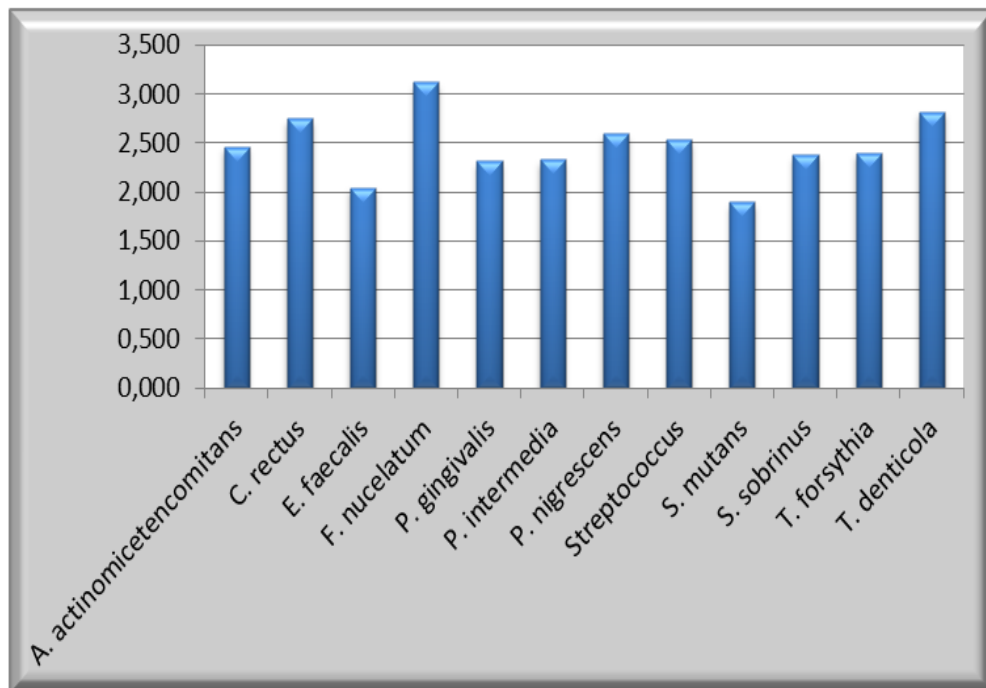


Figura 2. Distribuição das densidades médias totais (cél/mL X 10⁸) dos 12 micro-organismos testados em 31 amostras de canais radiculares com necrose pulpar.

A Figura 3 representa o somatório das densidades (cél/mL X 10⁸) encontradas para cada um dos 12 micro-organismos testados e sua proporção em relação à comunidade microbiana total. O somatório médio das densidades foi 29,62 cél/mL X 10⁸ e correspondeu a 80,57% da comunidade microbiana total dos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar. Observa-se que a amostra 7 foi a que teve o menor número de micro-organismos identificados (29,72 cél/mL X 10⁸ de um total de 46,92 cél/mL X 10⁸), o que correspondeu a 63,34%; a amostra 28 foi a que apresentou o maior número de micro-organismos identificados (45,26 cél/mL X 10⁸ de um total de 48,11 cél/mL X 10⁸), o que correspondeu a 94,06%.

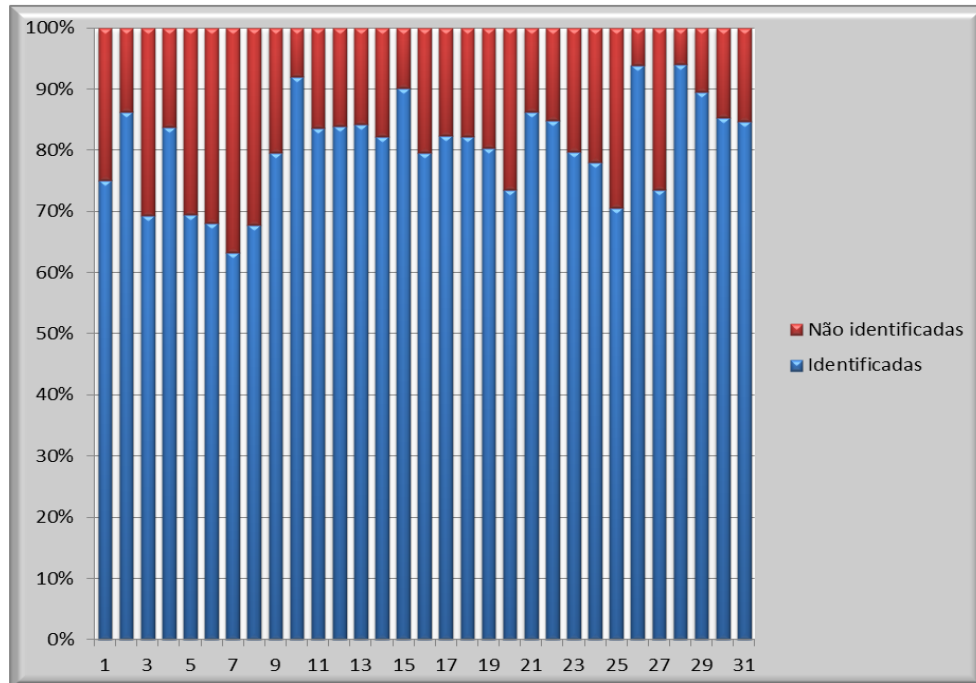


Figura 3. Distribuição em porcentagem das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados e identificados e não identificados em relação à comunidade microbiana total de canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar para cada amostra (n = 31).

As Figuras 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam as distribuições médias das densidades (\pm desvio-padrão) dos micro-organismos ($\text{cél/mL} \times 10^8$), de acordo com os sinais e sintomas clínicos e radiográficos (dor, edema, fístula, radioluscência e reabsorção radicular patológica, respectivamente) observados nas 31 amostras analisadas. Os resultados do teste *t* de Student demonstraram que houve uma diferença no número médio das densidades observadas entre a espécie *T. denticola* e a presença de dor ($3,01 \text{ cél/mL} \times 10^8$), e *T. denticola* e a ausência de dor ($2,13 \text{ cél/mL} \times 10^8$), com diferença estatística significativa ($p = 0,02$). Foi observada também uma diferença no número médio das densidades da espécie *P. nigrescens* e presença de edema ($3,47 \text{ cél/mL} \times 10^8$), e *P. nigrescens* e ausência de edema ($2,22 \text{ cél/mL} \times 10^8$); assim como para o gênero *Streptococcus* e presença de edema ($3,34 \text{ cél/mL} \times 10^8$), e *Streptococcus* e ausência de edema ($2,19 \text{ cél/mL} \times 10^8$), com diferença estatística significativa ($p = 0,04$; $p = 0,04$, respectivamente).

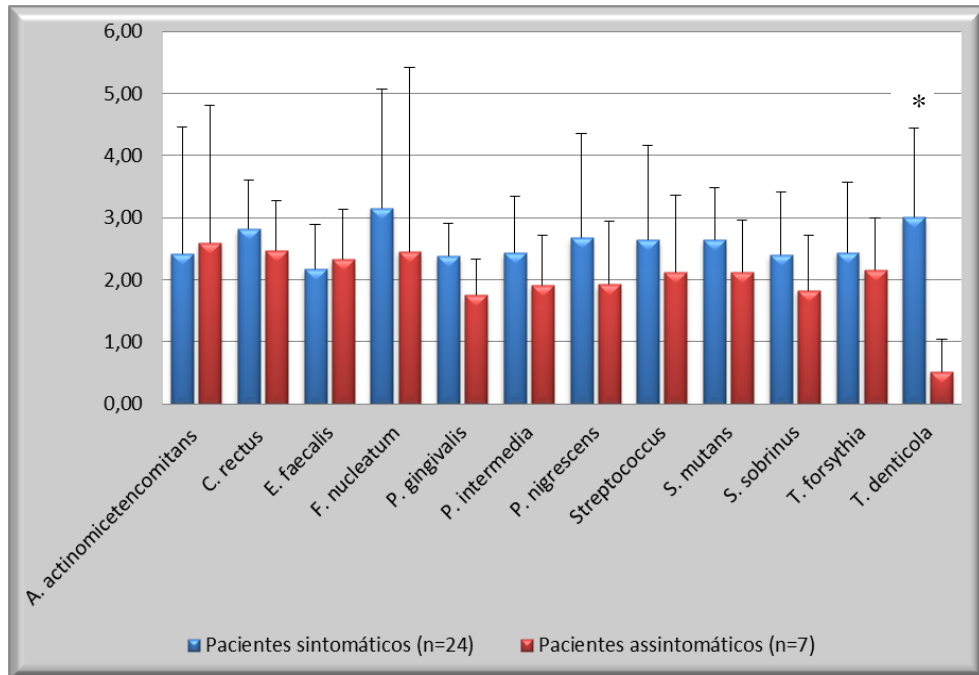


Figura 4. Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável dor avaliada para cada amostra (n = 31)
 * *T. denticola* apresentou uma diferença estatística significativa em relação à presença de dor nos indivíduos ($p = 0,02$).

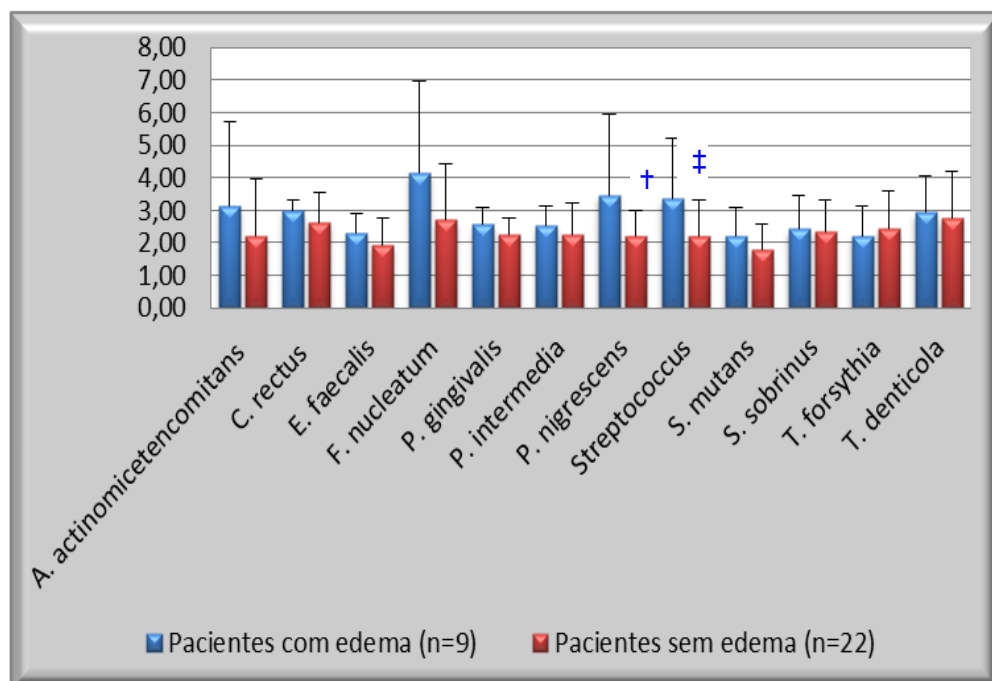


Figura 5. Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável edema avaliada para cada amostra (n = 31).
 † *P. nigrescens* apresentou uma diferença estatística significativa em relação à ausência de edema ($p = 0,04$).
 ‡ *Streptococcus* apresentou uma diferença estatística significativa em relação à ausência de edema a ($p = 0,04$).

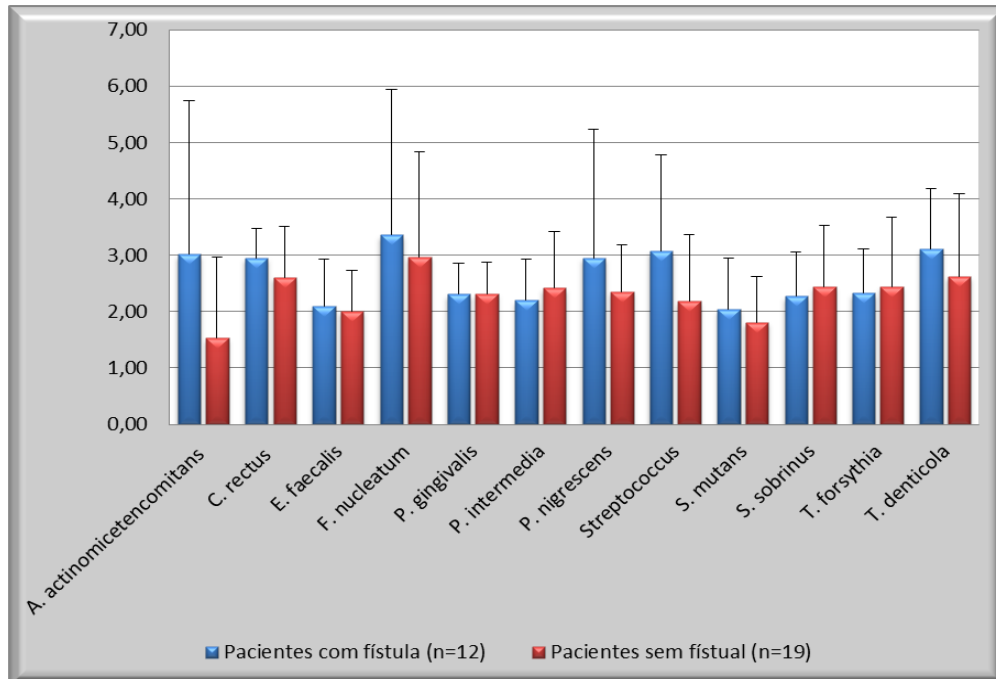


Figura 6. Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável fístula avaliada para cada amostra (n = 31).

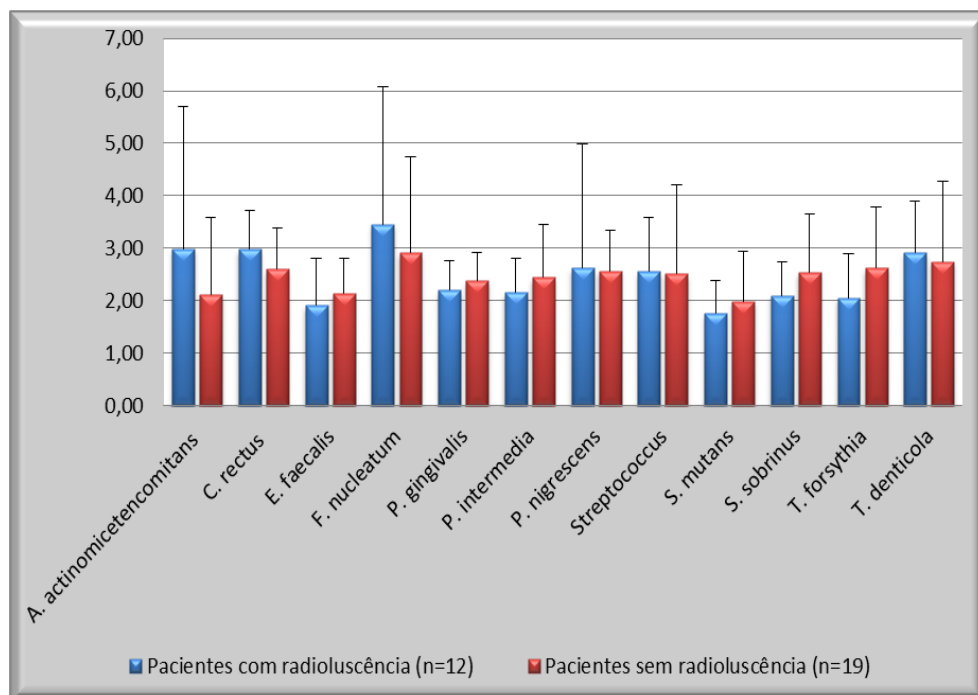


Figura 7. Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável radiolucência avaliada para cada amostra (n = 31).

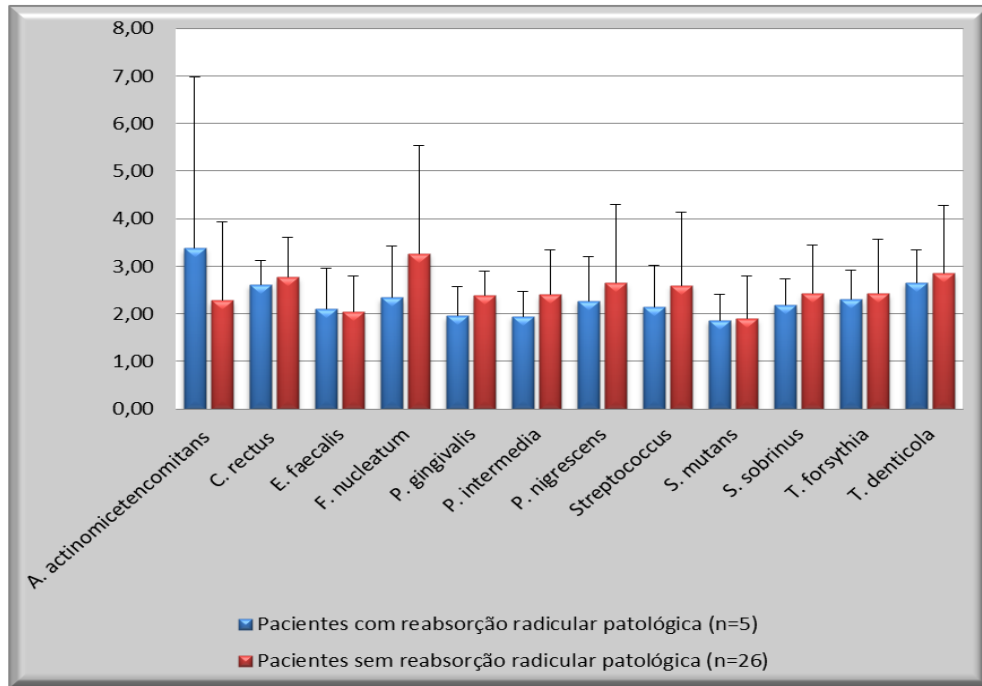


Figura 8. Distribuição das densidades médias totais dos 12 micro-organismos testados em relação à variável reabsorção radicular patológica avaliada para cada amostra (n = 31)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado para identificar e quantificar micro-organismos presentes nos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar por meio da técnica de *FISH*.

A microbiota dos canais radiculares de dentes decíduos foi anteriormente investigada por meio de métodos de cultura (COHEN, JORESS e CALISTI, 1960; da SILVA et al., 2006; FARIA et al., 2005; GOMES et al. 2004; ITO et al., 2011; MARSH e LARGENT, 1967; PAZELLI et al., 2003) e métodos moleculares como PCR (COGULU et al., 2008; FABRIS, NAKANO e AVILA-CAMPOS, 2014; GOMES et al., 2013), hibridização DNA-DNA (ITO et al., 2011; RUVIÉRE et al., 2007; TAVARES et al., 2011; TRICHES et al., 2014) e MDA (TAVARES et al., 2011). Segundo o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a utilizar a técnica de *FISH* na identificação e quantificação da microbiota de dentes decíduos com infecção endodôntica primária.

A técnica de *FISH* é um método rápido e objetivo que fornece resultados quantitativos diretos, sem uma cultura prévia, com visualização e contagem das células microbianas individualmente pelas informações da microscopia (AMANN et al., 1990; DEL'DUCA e CESAR, 2007; DELONG, WICKHAM e PACE, 1989; GMÜR e THURNHEER, 2002; LOY et al., 2006; MACHADO et al., 2012; MOTER e GÖBEL, 2000). Além disso, estudo recente demonstrou que o limite de detecção da técnica de *FISH* é 10^3 , maior, portanto, que o da hibridização DNA-DNA (LI e GU, 2011).

Todos os 31 canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar mostraram evidência positiva para os micro-organismos testados. Observou-se uma predominância decrescente das bactérias *F. nucleatum*, *T. denticola*, *C. rectus*, *P. nigrescens*, do gênero *Streptococcus*, seguido das bactérias *A. actinomycencomitans*, *T. forsythia*, *S. sobrinus*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *E. faecalis* e *S. mutans*.

Estudos anteriores realizados com a utilização de métodos moleculares demonstraram a predominância das bactérias *F. nucleatum* (FABRIS, NAKANO e AVILA-CAMPOS, 2014; TAVARES et al., 2011; TOPCUOGLU, BOZDOGAN e KULEKCI, 2013; TRICHES et al., 2014), *T. denticola* (COGULU et al., 2008;

RUVIÉRE et al., 2007; TOPCUOGLU, BOZDOGAN e KULEKCI, 2013), *C. rectus* (RUVIÉRE et al., 2007), *P. nigrescens* (FABRIS, NAKANO e AVILA-CAMPOS, 2014; GOMES et al., 2013; TAVARES et al., 2011), *T. forsythia* (TRICHES et al., 2014), *P. intermedia* (TAVARES et al., 2011), *P. gingivalis*, e *E. faecalis* (FABRIS, NAKANO e AVILA-CAMPOS, 2014; TRICHES et al., 2014).

Os resultados do presente estudo confirmaram observações obtidas em estudos com métodos de cultura sobre a prevalência do gênero *Streptococcus* (da SILVA et al., 2006; ITO et al., 2011; MARSH e LARGENT, 1967; PAZELLI et al., 2006). A espécie *S. sobrinus* parece não ter sido testada anteriormente em nenhum estudo com métodos de cultura e não foi encontrada nos estudos com métodos moleculares. A espécie *S. mutans* apresentou a menor média de densidade bacteriana e correlação significativa com as espécies *S. sobrinus*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *C. rectus*, *E. faecalis* e com o gênero *Streptococcus*. Embora pareça também não ter sido testada por métodos moleculares, em estudos com métodos de cultura a prevalência desta espécie em dentes decíduos variou de 5 a 30% (da SILVA et al., 2006; FARIA et al., 2005; PAZELLI et al., 2003). Os diferentes resultados obtidos podem ser explicados pela possibilidade de exposição à cavidade bucal de alguns canais, o que aumentaria a sua presença (PAZELLI et al., 2003). No presente estudo, a maioria das amostras apresentava lesão cáriosa extensa com grande perda de estrutura dental coronária, sem impossibilitar, contudo, o isolamento absoluto e a posterior restauração do dente, o que faz com que os canais tenham comunicação com o meio bucal.

O estudo de Pazelli et al. (2003), que pesquisou o perfil bacteriano em dentes decíduos por meio de cultura, chamou a atenção para os dados de prevalência de *Streptococcus* em sua amostra que foi de 96,8% dos casos e de *S. mutans* de 48,4%. Nossos achados mostraram que a espécie *S. mutans* apresentou a menor média de densidade ($1,90 \text{ cél/mL} \times 10^8$), contra uma densidade de $2,53 \text{ cél/mL} \times 10^8$ para o gênero *Streptococcus*. Por outro lado, Pazelli et al. (2003) relataram não terem encontrado nenhum caso de *S. sobrinus*, espécie que detectamos em todas as amostras com uma densidade média de $2,38 \text{ cél/mL} \times 10^8$. *Streptococcus* e *S. mutans* são integrantes da microbiota do canal radicular de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical, normalmente encontrados em avaliação por meio de cultura (da SILVA et al., 2006; ITO et al., 2011; MARSH e LARGENT, 1967).

Resultado importante do presente estudo foi a observação da espécie *E. faecalis* em todas as amostras, assim como nos estudos de Fabris, Nakano e Avila-Campos (2014) e Triches et al. (2014). Trata-se de um patógeno oportunista que consegue resistir ao tratamento químico-mecânico, e que possui, também, capacidade de resistir a elevados níveis de pH, em função de seu potencial de formação de biofilme e pelo funcionamento de uma bomba de prótons que reduz o pH intracitoplasmático. Desta forma, o *E. faecalis* pode resistir a terapias endodônticas que utilizem o hidróxido de cálcio como medicação intracanal (PAULA, 2012).

Para todos os micro-organismos, foram realizados testes para se avaliarem as correlações entre eles e puderam ser observadas as seguintes correlações: *E. faecalis* com *C. rectus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, e *T. denticola*; *P. intermedia* com *F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*; *P. nigrescens* com *F. nucleatum*; *Streptococcus* com *C. rectus*, *P. gingivalis*, *S. mutans* e *S. sobrinus*; *S. mutans* com *C. rectus*; *S. sobrinus* com *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *S. mutans* e *T. denticola*; *T. forsythia* com *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *T. denticola*. Em uma investigação anterior, foram observadas, por meio de testes estatísticos de correlação, 81 possíveis associações estatisticamente significativas entre micro-organismos. Destaque foi dado à observação de que os micro-organismos não estão distribuídos nos canais radiculares de maneira aleatória, e também à importância do conhecimento das interações microbianas para o estabelecimento da patologia endodôntica (PETERS, WESSELINK e VAN WINKELHOFF, 2002). Interações entre diferentes grupos bacterianos permitem o estabelecimento de uma patologia, dificilmente encontrada quando os mesmos micro-organismos estão isolados (GOMES et al., 2004).

Os dados obtidos demonstraram a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas de dentes decíduos com predomínio de micro-organismos anaeróbios obrigatórios e facultativos em concordância com investigações anteriores realizadas com métodos de cultura (da SILVA et al., 2006; FARIA et al., 2005; GOMES et al., 2004; PAZELLI et al., 2003) ou com métodos moleculares (COGULU et al., 2008; ITO et al., 2011; RUVIÈRE et al., 2007; TAVARES et al., 2011; TOPCUOGLU, BOZDOGAN e KULEKCI, 2013; TRICHES et al., 2014). O conhecimento dessa natureza polimicrobiana é de extrema importância, uma vez que bactérias podem alterar seu comportamento se tornando mais virulentas devido a estresses advindos

de condições adversas do meio, como quando ocorre aumento da densidade populacional, escassez de nutrientes, alteração no pH e na temperatura. Em tais condições, os micro-organismos, por adaptação e/ou defesa realizam uma comunicação intercelular através de sinalização molecular, inserindo-se nos conceitos de biofilme e de comunidade microbiana. Assim a relação intra ou interespecie aumentam a chance deles sobreviverem, no meio o que vai tornando a infecção mais resistente (PAULA, 2012).

Existe uma diferença das características da composição da microbiota dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar (infecção primária) e daqueles tratados endodonticamente, mas que apresentam insucesso (infecção secundária/persistente). A presença de uma microbiota mista formada por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, principalmente anaeróbios, com no máximo dez espécies diferentes por canal radicular, é encontrada em infecções primárias. Por outro lado, nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, observa-se a predominância de micro-organismos anaeróbios facultativos e Gram-positivos, com uma média de uma ou duas espécies por canal radicular (Gomes et al., 2004). No presente estudo, avaliou-se a presença de 12 micro-organismos em dentes decíduos com infecção primária. Os resultados obtidos confirmaram as observações de Gomes et al. (2004), uma vez que foram identificadas 11 espécies, que incluíram espécies Gram-negativas anaeróbicas (*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. denticola* e *T. forsythia*), Gram-negativas anaeróbicas facultativas (*A. actinomycetemcomitans* e *C. rectus*), Gram-positiva anaeróbica (*S. sobrinus*), e Gram-positivas anaeróbicas facultativas (*E. faecalis* e *S. mutans*), além do gênero *Streptococcus*. Os micro-organismos identificados corresponderam aproximadamente a 81% da comunidade microbiana total investigada. Este resultado ressalta a apropriada opção pelos micro-organismos testados, apesar da diversidade de espécies que pode ser detectada em casos de infecções em canais radiculares com necrose pulpar (MONTAGNER, 2009). Vale destacar ainda, que as bactérias identificadas incluem-se entre aquelas dos gêneros microbianos mais frequentemente detectados nas infecções endodônticas primárias (SIQUEIRA Jr., 2002).

As pressões seletivas que ocorrem no interior dos canais radiculares sugerem que certas bactérias são mais capazes de sobreviver e de se multiplicar do que outras, favorecendo, assim, o crescimento de anaeróbios obrigatórios no interior

dos canais radiculares com infecção primária e o crescimento de anaeróbios facultativos em infecções endodônticas secundárias (GOMES et al., 2004; ITO et al., 2011).

Os resultados do teste *t* de Student demonstraram que houve uma diferença significativa ($p = 0,02$) entre no número médio das densidades observadas na espécie *T. denticola* no grupo com presença de dor ($3,01 \text{ cél/mL} \times 10^8$), e o grupo com ausência de dor ($2,13 \text{ cél/mL} \times 10^8$). Também foram observadas diferenças significantes no número médio das densidades da espécie *P. nigrescens* e presença de edema, $3,47 \text{ cél/mL} \times 10^8$, e *P. nigrescens* e ausência de edema, $2,22 \text{ cél/mL} \times 10^8$; assim como para o gênero *Streptococcus* e presença de edema, $3,34 \text{ cél/mL} \times 10^8$, e *Streptococcus* e ausência de edema, $2,19 \text{ cél/mL} \times 10^8$ ($p = 0,04$; $p = 0,04$, respectivamente). Estes achados não estão de acordo com os do estudo de Cogulu et al. (2008) que demonstraram que a dor à percussão está relacionada com a espécie *P. gingivalis* e que a dor junto com a lesão estão associadas às espécies *T. denticola* e *E. faecalis*. O estudo de Gomes et al. (2004) correlacionou a presença de edema a *Porphyromonas spp.* e a dor às espécies *P. intermedia* e *P. nigrescens*.

No presente estudo, de todas as amostras obtidas, 24 casos eram sintomáticos e sete eram assintomáticos. Observou-se que as espécies com maiores densidades entre os dentes sintomáticos foram: *P. nigrescens*; *C. rectus*; *T. denticola*; e *F. nucleatum*, com densidades de 2,67; 2,83; 2,95; $3,05 \text{ cél/mL} \times 10^8$, respectivamente. Este resultado está de acordo com o relatado no estudo de Gomes et al. (2004), que associaram os sintomas dor aguda, histórico de dor anterior, sensibilidade à percussão e inchaço com micro-organismos Gram-negativos, especialmente *Prevotella*, *Porphyromonas spp.* e *Fusobacterium*. Os autores afirmaram ainda que micro-organismos Gram-negativos contêm endotoxinas, que podem estimular a produção de bradicinina, um potente mediador de dor, sendo provável, assim, que ela esteja associada com exacerbações infecciosas dolorosas durante o tratamento endodôntico. E a dor é um dado importante para a Odontopediatria, uma vez que dificulta o controle de comportamento do paciente durante o tratamento odontológico.

Em infecções endodônticas crônicas, bactérias e seus sub-produtos não estão presentes apenas no canal principal do dente e sim em todo o sistema de canais radiculares (SCR). Portanto, um dos objetivos da preparação mecânica do canal radicular associado a soluções irrigadoras é a eliminação da infecção. Devido

ao fato de eles não estarem apenas na raiz principal, mas também no SCR e em regiões mais profundas, estando, assim, espalhados pela dentina mais próxima da raiz, região inacessível para erradicação durante o preparo mecânico do canal, a utilização de soluções irrigadoras eficientes e medicação intracanal específica entre as sessões para os micro-organismos ali presentes torna-se imprescindível para um tratamento eficaz (FARIA et al., 2005; ITO et al., 2011; TANNURE et al., 2009). Da mesma forma, os cimentos obturadores também devem permitir uma obturação de boa qualidade.

A identificação dos integrantes da comunidade polimicrobiana da infecção endodôntica em dentes decíduos é importantíssima para que o tratamento a ser realizado. Assim as medicações entre sessões, soluções irrigadoras, cimentos obturadores e outros medicamentos empregados, poderão ser cada vez mais específico para a infecção instalada, visando, diminuir o insucesso do tratamento, para que o dente decíduo permaneça na cavidade bucal até a época própria de exfoliação, a fim de desempenhar suas funções.

A utilização da técnica de *FISH* permitiu a identificação de micro-organismos presentes na infecção de dentes decíduos com necrose pulpar, que integram os grupos *Bacteria* e *Archea*. Paster et al. (2001) relataram que cerca de 700 diferentes espécies, pertencentes a 11 filos do domínio *Bacteria*, foram detectadas na cavidade bucal de humanos. Cerca de 50% destas bactérias não tinham sido ainda isoladas em 2001, sendo somente conhecidas através de suas sequências de 16S rRNA. Posteriormente, Aas et al. (2005), empregando avaliação do 16S rRNA, determinaram a divisão das espécies microbianas presentes na cavidade bucal em seis filotipos: *Firmicutes* (*Streptococcus*, *Gemella*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella*); *Actinobacteria* (*Atopobium*, *Rothia*); *Proteobacteria* (*Neisseria*, *Eikenella*, *Campylobacter*); *Bacteroidetes* (*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*); *Fusobacteria* (*Fusobacterium*, *Leptotrichia*); e *Filo TM7* de micro-organismos ainda não cultiváveis. Futuros estudos conduzidos com a técnica de *FISH* poderão investigar a importância clínica de micro-organismos ainda não testados no estabelecimento da infecção pulpar de dentes decíduos.

Além de serem de claro interesse científico para a área acadêmica do conhecimento, os resultados obtidos neste estudo têm inquestionável importância clínica, uma vez que contribuem para a busca de estratégias antimicrobianas eficazes para eliminar os componentes da microbiota de dentes decíduos com

necrose pulpar, que são essenciais para uma melhor prática clínica, baseada na evidência científica, desta controversa área de tratamento da Odontopediatria.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- Todos os micro-organismos testados foram observados em todos os casos examinados e corresponderam a 80,57% da comunidade microbiana total da infecção da polpa dos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar.
- Quantitativamente, identificou-se a predominância, em ordem decrescente, dos micro-organismos *F. nucleatum*, *T. denticola*, *C. rectus*, *P. nigrescens*, *Streptococcus*, *A. actinomycetencomitans*, *T. forsythia*, *S. sobrinus*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *E. faecalis* e *S. mutans*.
- Correlações positiva foram encontradas entre os micro-organismos:
 - *E. faecalis* com *C. rectus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, e *T. denticola*;
 - *P. intermedia* com *F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*;
 - *P. nigrescens* com *F. nucleatum*;
 - *Streptococcus* com *C. rectus*, *P. gingivalis*, *S. mutans* e *S. sobrinus*;
 - *S. mutans* com *C. rectus*;
 - *S. sobrinus* com *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *S. mutans* e *T. denticola*;
 - *T. forsythia* com *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *T. denticola*.
- Os resultados do teste *t* de Student demonstraram que houve diferença significativa no número médio das densidades observadas entre a espécie *T. denticola* e a presença de dor, $3,01 \text{ cél/mL} \times 10^8$, e *T. denticola* e a ausência de dor, $2,13 \text{ cél/mL} \times 10^8$. Foram observadas diferenças significantes no número médio das densidades da espécie *P. nigrescens* e presença de edema, $3,47 \text{ cél/mL} \times 10^8$, e *P. nigrescens* e ausência de edema, $2,22 \text{ cél/mL} \times 10^8$; assim como para o gênero *Streptococcus* e presença de edema, $3,34 \text{ cél/mL} \times 10^8$, e *Streptococcus* e ausência de edema, $2,19 \text{ cél/mL} \times 10^8$ ($p = 0,04$; $p = 0,04$, respectivamente).

- A técnica de hibridização *in situ* fluorescente confirmou a natureza polimicrobiana da infecção endodôntica de canais radiculares de dentes decíduos, na qual estão presentes bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas e do gênero *Streptococcus*.

8 REFERÊNCIAS

AAS, J. A. et al. Defining the normal bacteria flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, Nov. 2005.

AMANN, R. I. et al. Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1919-1925, June 1990.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. **Pediatr Dent**, Chicago, v. 34, n. 6, p. 222-229, 2012/2013.

BEHR, T. et al. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. **Syst Appl Microbiol**, Stuttgart, v. 23, n. 4, p. 563-572, Dec. 2000.

COGULU, D. et al. PCR' based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 106, n. 3, p. 443-449, Sept. 2008.

COHEN, M. M.; JORESS, S. M. e CALISTI, L. P. Bacteriologic study of infected deciduous molars. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 13, n. 11, p. 1382-1386, Nov. 1960.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5116-5122, Dec. 2000.

da SILVA, L. A. B. et al. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 2, p. 144-148, 2006.

¹ Formação segundo Normas de Elaboração de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2006 (Disponível em <http://www.ufjf.br/>).

DEL'DUCA, A. e CESAR, D. E. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) como opção de ferramenta em ecologia microbiana aquática. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 6-9, maio 2007.

DELONG, E.F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N.R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science (Wash)**, Washington, v. 243, n. 4896, p. 1360-1363, Mar. 1989.

FABRIS, A. S., NAKANO, V. e AVILA-CAMPOS, M. J. Bacteriological analysis of necrotic pulp and fistulae in primary teeth. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 22, p. 118-124, Mar./Apr. 2014.

FARIA, G. et al. Antibacterial effect of root canal preparation and calcium hydroxide paste (Calen) intracanal dressing in primary teeth with apical periodontitis. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 13, n. 4, p. 351-355, Oct./Dec. 2005.

GAJAN, E. B. et al. Microbial flora of root canals of pulpally-infected teeth: *Enterococcus faecalis* a prevalent species. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospect**, Tabris, v. 3, n. 1, p. 24-27, Winter 2009.

GIOVANNONI, S. J. et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. **J Bacteriol**, Baltimore, v. 170, n. 2, p. 720-726, Feb. 1988.

GMÜR, R.; THURNHEER, T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. **Microbiology**, Reading, v. 148 (Pt. 5), p. 1379-1387, May 2002.

GOMES, B. G. et. al. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 149-155, Mar./Apr. 2013.

GOMES, B. P. F. A., et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbial Immunol**, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 71-76, Feb. 2004.

ITO, I. Y. et al. 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 Paediatric Dent**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 353-360, Sept. 2011.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 20, n. 3, p. 340-349, Sept. 1965.

LI, M.; GU, J. Advances in methods for detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, Berlin, v. 90, n. 4, p. 1241-1252, Apr. 2011.

LOY, A. et al. ProbeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic Acids Res**, London, v. 35, Database issue, p. D800-804, Jan. 2007.

MACHADO, F. C. Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 443-449, Sep./Oct. 2012.

MARÉ, L; WOLFAARDT, G. M.; DICKS, L. M. T. Adhesion of *Lactobacillus lanthanum* 423 and *Lactobacillus salivarius* 241 to the intestinal tract of piglets, as recorded with fluorescent in situ hybridization (FISH), and production of plantaricin 423 by cells colonized to the ileum. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 100, n. 4, p. 838-844, Feb. 2006.

MARSH, S. J.; LARGENT, M. D. A bacteriological study of the pulp canals of infected primary molars. **ASCD J Dent Child**, Chicago, v. 34, n. 6, p. 460-470, Nov. 1967.

MONTAGNER, F. **Identificação microbiológica em dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e a suscetibilidade antimicrobiana de algumas bactérias anaeróbias isoladas**. 2009. 181 f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2009.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **J Microbial Methods**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-112, Jul. 2000.

MOTER, A. et al. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. **Microbiol**, Washington, v. 144, n. 9, p. 2459-2467, Sept. 1998.

MOTER, A. et al. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1399-1403, May. 1998.

PASTER, B. J. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol**, Washington, v. 183, n. 12, p. 3770-3783, 2001.

PAULA, V. A. C. **Avaliação da comunidade microbiana, com ênfase para a espécie *Enterococcus faecalis*, em dentes decíduos com necrose pulpar através de técnicas fenotípicas e moleculares.** 2012. 141 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

PAZELLI, L. C. et al. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 367-371, out./dez. 2003.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; VAN WINKELHOFF, A. J. Combination of bacterial species in endodontic infections. **Int Endod J**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 698-702, Aug. 2002.

RIEP, B. et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? **J Clin Microbiol**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1705-1711, Jun. 2009.

RUVIÉRE, D. B. et al. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. **J Dent Child**, Chicago, v. 74, n. 2, p. 118-123, May/Aug. 2007.

SATO, T. et al. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. **Microb Ecol Health Dis**, Oslo, v. 6, n. 6, p. 269-275, 1993.

SCALIONI, F. A. R. **Experiência de cárie dentária e bactérias cariogênicas detectadas e quantificadas pelo método da hibridização in situ fluorescente na saliva de crianças com síndrome de Down.** 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

SIQUEIRA Jr., J. F. Endodontic Infections: Concepts, paradigms and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 94, n. 3, p.281-293, Sept. 2002.

SIQUEIRA Jr., J. F.; RÔÇAS, I. N. The microbiota of acute apical abscesses. **J Dent Res**, Washington, v. 88, n. 1, p. 61-65, Jan. 2009.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 134-144, Feb. 1998.

SOGIN, M. L. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored rare biosphere. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, Aug. 2006.

SUNDE, P. T. et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 5, p. 1095-1102, May. 2003.

TANNURE, P. N. et al. Histopathologic and SEM analysis of primary teeth with pulpectomy failure. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 108, n. 1, p. 29-33, July 2009.

TAVARES, W. L. F. et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Int Endod J**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 225-235, Mar. 2011.

THURNEER, T.; GMUR, R.; GUGGENHEIM, B. Multiplex FISH analysis of a sixspecies bacterial biofilm. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 37-47, Jan. 2004.

TOPCUOGLU, N.; BOZDOGAN, E.; KULEKCI, G. Presence of oral bacterial species in primary endodontic infections of primary teeth. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, v. 38, n. 2, p. 155-160, 2013.

TOYOSHIMA, Y. et al. A bacteriological study of periapical pathosis on deciduous teeth. **J Pedod**, Boston, v. 26, n. 3, p. 449-458, 1988.

TREBESIUS K. et al. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. **Med Microbiol Immunol**, Berlim, v. 188, n. 4, p. 169-175, Jun. 2000.

TRICHES, T.C. et al. Microbial profile of root canals of primary teeth with pulp necrosis and periradicular lesion. **J Dent Child**, Chicago, v. 81, n.1, p. 14-19, Jan./Apr., 2014.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

NOME DO SERVIÇO DO PESQUISADOR

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: ROSANGELA ALMEIDA RIBEIRO

ENDEREÇO: RUA SANTO ANTÔNIO, 1098 APT 204 CENTRO

JUIZ DE FORA (MG) - CEP: 36.016-210

FONE: (32) 3213-5714

E-MAIL: ralmeida@powerline.com.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações aqui contidas foram fornecidas pela pesquisadora Rosangela Almeida Ribeiro para firmar acordo por escrito, em duas vias (pesquisador/responsável), mediante o qual o responsável legal pelo menor selecionado para a pesquisa, autoriza sua participação, com conhecimento total da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem coação.

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a autorizar que o menor participe como voluntário (a) da pesquisa **“Espécies de micro-organismos detectadas e quantificadas pelo método da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em canais radiculares de dentes decíduos contaminados.”**. Neste estudo pretendemos identificar e quantificar bactérias presentes no canal radicular de dente decíduo contaminado.

O motivo que nos leva a estudar as espécies bacterianas contidas no canal radicular dos dentes decíduos contaminados são que uma vez conhecidas e quantificadas as espécies presentes, os tratamentos endodônticos poderão ser realizados com uma maior taxa de sucesso, pois tais bactérias são importantes no estabelecimento e desenvolvimento da doença.

Para esse estudo adotaremos os seguintes procedimentos: exame clínico, radiográfico e coleta de amostras do conteúdo do sistema de canais radiculares para análise de micro-organismos presentes em infecções endodônticas de dentes decíduos entre crianças selecionadas, e posterior tratamento endodôntico e restaurador do dente envolvido. Durante os procedimentos há um risco mínimo de desconforto, e o risco do menor engolir os cones e/ou limas serão prevenidos pelo uso de fio dental para amarrar estes durante sua permanência na boca. E o isolamento absoluto do campo também contribui significativamente para que não ocorra deglutição e/ou aspiração dos instrumentos envolvidos nos procedimentos.

O responsável tem a obrigação de comparecer à consulta agendada para exame da criança e consultas sequentes do tratamento e coleta de micro-organismos.

Os responsáveis têm a garantia de que receberão respostas às suas perguntas e esclarecimentos das dúvidas sobre o estudo sempre que preciso e têm a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo. Em caso de dúvidas, contatar a pesquisadora na Rua Santo Antônio, no 1098 apt 204, bairro Centro, em Juiz de Fora – MG – CEP: 36.016-210, ou pelo telefone residencial (32) 3226-3515, ou pelo telefone celular (32) 8865-6490, ou mesmo no Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF no Campus Universitário s/n – telefone (32) 3229-3788 ou pelo e-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br. As crianças selecionadas

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de micro-organismos presentes em canais radiculares de dentes deciduos contaminados.

Pesquisador: Rosângela Almeida Ribeiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10723712.4.0000.5147

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA (UFJF)

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 226.775

Data da Relatoria: 24/01/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo bem delineado, boa fundamentação, justificativa pertinente e valor científico.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos propostos apresentam clareza e compatibilidade com a proposta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Pesquisa de risco mínimo. Foram citados os benefícios que a pesquisa trará. Informa que o pesquisador se responsabilizará por possíveis danos que possam ser gerados aos sujeitos, pela participação na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo está bem delineado e fundamentado e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 196/96 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão claros, trazem todas as informações necessárias.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)3102-3788 Fax: (32)3102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



Recomendações:

Solicitamos que seja enviado para este CEP o relatório final do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

JUIZ DE FORA, 22 de Março de 2013

Assinado por:
Paulo Cortes Gago
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SÃO PEDRO CEP: 36.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)3103-3788 Fax: (32)3103-3788 E-mail: cep.proposa@ufjf.edu.br

ANEXO B

FICHA DA DISCIPLINA ODONTOPEDIATRIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



PRONTUÁRIO ODONTOLÓGICO

1. IDENTIFICAÇÃO - DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Matricula: _____
 Sexo: _____ Cor: _____ Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Grau escolar: _____
 Residência: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____ UF: _____ Telefone: _____
 Filiação: - Pai: _____
 - Mãe: _____

2. ANAMNESE

- 2.1 Já foi ao dentista alguma vez? () Sim () Não
 Se afirmativo, qual foi o seu comportamento? _____

- 2.2 Tem atualmente algum problema médico? () Sim () Não
 Em caso afirmativo, qual? _____
 Médico pediatra: _____
- 2.3 Quais doenças já teve? Quando? _____

- 2.4 Quando a criança se fere, costuma: () Sangrar muito () Logo passa a hemorragia
 Tem problema de sangramento nasal: () Sim () Não
 Frequencia: _____
- 2.5 Já tomou anestesia? () Sim () Não
 Teve reação alérgica à anestesia? () Sim () Não
- 2.6 Medicamentos:
 Atuais: _____
 Passados: _____
- 2.7 Alguma vez manifestou reação alérgica? () Sim () Não
- 2.6 Antecedentes hereditários:
 Pai: _____
 Mãe: _____
 Familiares: _____
- 2.9 Número de irmãos: _____ Tipo de parto: _____
- 2.9 Observações: _____

- Assinatura do responsável: _____

Juiz de Fora, ____/____/____

DATA

ASSINATURA DO ALUNO

ASSINATURA DO PROFESSOR

ODONTOPEDIATRIA

ALUNO: _____ Período: _____

ALUNO: _____ Período: _____

OBS.: Antes de iniciar o tratamento, repassar os dados da anamnese para verificar se não houve qualquer alteração.

EXAME CLÍNICO

Data do exame: ____ / ____ / ____

1. Queixa principal: _____

2. Observações do profissional com a criança e com o responsável na primeira consulta: _____

3. Higiene bucal ao exame clínico:

1. Boa Regular Má

4. Escovação:

- Correta Incorreta Não escova

5. Hábitos:

- Sucção de dedo Interposição de língua Sucção de lábio
 Sucção de chupeta Respiração bucal Outros

6. Oclusão:

6.1 Dentição decídua

- Arco tipo I Arco tipo II Arco misto
 Presença de espaços primatas Ausência de espaços primatas
- **Relação dos segundos molares decíduos:**
 Plano Degrau mesial para a mandíbula Degrau distal para a mandíbula
- **Relação de caninos decíduos:**
 Normal méso-oclusão Disto-oclusão
- **Incisivos:**
 Sobremordida Sobressaliência
- **Modida aberta:**
 Anterior Posterior
- **Mordida cruzada:**
 Anterior Posterior

6.1 Dentição decídua

- **Relação dos primeiros molares permanentes:**
 Topo Classe I Classe II Classe III
- **Incisivos:**
 Sobremordida Sobressaliência
- **Modida aberta:**
 Anterior Posterior
- **Mordida cruzada:**
 Anterior Posterior

7. Exame intra-bucal:

Lábios _____

Mucosa jugal _____

Inserção de freios

- Labial superior _____
- Labial inferior _____
- Lingual _____

Palato _____


















Assoalho de boca _____

Gengiva _____

Deglutição _____

Fonação _____

**ODONTOGRAMA - EXAME CLÍNICO (TECIDOS MOLES E DUROS)
USAR CORES DIFERENTES PARA CONDIÇÃO DE SAÚDE E CONDIÇÃO DE DOENÇA**

	17:	_____
	16:	_____
	...5:	_____
	...4:	_____
	...3:	_____
	...2:	_____
	...1:	_____
	...1:	_____
	...2:	_____
	...3:	_____
	...4:	_____
	...5:	_____
	26:	_____
	27:	_____
	37:	_____
	36:	_____
	...5:	_____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE-FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG – MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Samira Salomão Lemos

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EM DENTES
DECÍDUOS COM NECROSE PULPAR POR MEIO DA
TÉCNICA DA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (*FISH*)**

Juiz de Fora
2014

LEMOS, S.L. Identificação e quantificação de bactérias em dentes decíduos com necrose pulpar por meio da técnica da hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*), Universidade Federal de Juiz de Fora. 2014. 87f. Apresentação de Dissertação (Curso de Pós-Graduação stricto sensu – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (MG).