

ANÁLISE DA MICROBIOTA AERÓBICA ENDODÔNTICA DE DENTES COM E SEM LESÃO PERIAPICAL

SANTOS, Evimar Lopes dos¹
GAZZONI, Alexandra Flávia²
WAGNER, Cláudia^{3*}

Resumo: As bactérias são o principal agente etiológico das patologias pulpares e periradiculares, exercendo importante papel tanto na indução quanto na perpetuação de processos inflamatórios da polpa e do periápice. Conhecer a microbiota envolvida nas diferentes fases de evolução da infecção endodôntica é, portanto, de extrema importância para o correto tratamento de cada caso. O presente estudo teve como objetivo qualificar e quantificar os microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas de dentes com e sem lesão periapical visível ao exame radiográfico de pacientes da clínica odontológica da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG) atendidos de fevereiro à maio de 2015. Para tal se coletou material necrótico do interior dos canais radiculares destes elementos com o auxílio de limas endodônticas #15 que foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI que foram incubados em aerobiose à 37° por 48h. Posteriormente se utilizou estes caldos para semeadura em placas de Petri com Ágar BHI para identificação das espécies e contagem das UFC/ml. No grupo dos dentes sem lesão periapical foi encontrada menor variedade de espécies bacterianas cultiváveis, mas um maior número de bactérias quando comparado ao grupo de dentes com lesão periapical ($p < 0,01$). Conclui-se, portanto, que dentes com infecções endodônticas primárias apresentam rica microbiota endodôntica que sofre alterações de quantidade e variedade conforme a doença evolui, com diminuição dos microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos e aumento dos anaeróbios estritos.

Descritores: Endodontia; Microbiologia; Polpa Dentária; Lesão Periapical.

Abstract: Bacteria are the main agent of pulp and periradicular diseases, playing an important role in both the induction and perpetuation of inflammatory processes of the pulp and periapex. Knowing the microbiota involved in different stages of evolution of endodontic infection is therefore extremely important for the correct treatment of each case. This study aimed to qualify and quantify the microorganisms involved in endodontic infections of teeth with and without periapical lesion visible to the radiographic examination of patients of the dental clinic of the Serra Gaúcha College (FSG) met from February to May 2015. For this necrotic material from the root canal these elements was collected with the aid of endodontic files # 15 which were put in test tubes containing BHI broth and incubated aerobically at 37°C for 48h. Subsequently these broths were used for seeding Petri dishes with agar BHI for species identification and counting of CFU / ml. In the group of teeth without periapical lesion was found smaller variety of bacterial species, but a larger number of bacteria compared to group of teeth with periapical lesions ($p < 0.01$). It follows, therefore, that primary teeth with endodontic infections feature rich endodontic microbes suffering quantity and variety changes as the disease progresses with decrease of aerobic and facultative anaerobic microorganisms and the increase of strict anaerobes.

Keywords: Endodontic; Microbiology; Tooth Polp; Periapical Lesion.

INTRODUÇÃO

As bactérias são o principal agente etiológico das patologias pulpares e periapicais, exercendo importante papel na indução e perpetuação de processos inflamatórios na polpa e no periápice¹. Conforme a infecção avança, as bactérias e seus subprodutos alcançam toda a extensão do sistema de canais radiculares, ocasionando o desenvolvimento de lesão periapical². Com essa evolução, o perfil bacteriano no interior dos canais radiculares também se altera;

se por um lado temos o aumento da quantidade de bactérias, por outro temos a diminuição da variedade de espécies bacterianas que conseguem sobreviver a um ambiente cada vez mais hostil³.

A infecção dos canais radiculares é única na cavidade oral, visto que ela se estabelece em um ambiente previamente livre de microrganismo⁴. Este processo inicia-se depois de uma necrose pulpar como resultado de cárie, trauma ou procedimentos iatrogênicos, quando as bactérias invadem e colonizam o sistema de canais radiculares⁵.

¹ Professora do Curso de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG).

² Doutora em Medicina pela UFRGS. Professora do Curso de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG).

³ Especialista em Endodontia pela PUCRS, Mestre em Odontologia pela PUCRS. Professora do Curso de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG).

Os microrganismos isolados, com maior frequência dos canais radiculares infectados são predominantemente os anaeróbios estritos, como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Menos frequentemente são *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella* spp. Os anaeróbios facultativos mais comuns são cocos, dos gêneros *Enterococcus* e *Gemella*. É relatada a presença ocasional de espécies *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus* spp. e mais raramente são isolados *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes* spp.⁶. No que diz respeito os microrganismos aeróbios, são importantes agentes causadores de lesões endodônticas os seguintes gêneros: *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Mima* spp., *Pseudomonas* spp. e *Micrococcus* spp.^{7,8}. Também foram isoladas espiroquetas, *Mycoplasma* spp., bem como espécies do gênero *Candida* ssp.⁹.

Dessa forma, para entender completamente a etiopatogenia das patologias pulpares e periapicais e assim desenvolver estratégias mais efetivas para o tratamento endodôntico, é necessário entender a composição da microbiota presente no sistema de canais radiculares, o que é particularmente importante já que a presença de lesão apical é um dos maiores indicadores para o sucesso ou o insucesso desta terapia¹⁰. Sendo assim, a análise da microbiota de dentes com infecção endodôntica em suas diferentes fases de evolução é de extrema importância não só para o entendimento da doença, mas também para o correto tratamento e prognóstico de cada caso¹¹. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a microbiota endodôntica de dentes com e sem lesão periapical visível radiograficamente, bem como quantificar as unidades formadoras de colônia (UFC/ml) das principais espécies bacterianas envolvidas na infecção endodôntica de dentes com necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente de pacientes da clínica de Odontologia da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG) da cidade de Caxias do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FSG (CAAE45273315.1.0000.5311) e todos os participantes do estudo foram devidamente informados e esclarecidos sobre os objetivos e riscos da pesquisa e autorizaram sua participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídos deste estudo pacientes com antibioticoterapia prévia há menos de 3 meses, pacientes com imunodeficiência, dentes com tratamento endodôntico prévio, dentes com impossibilidade de se estabelecer isolamento absoluto e dentes que se encontravam com a câmara pulpar aberta ao meio bucal no momento da coleta.

A coleta das amostras foi realizada durante a primeira consulta de tratamento endodôntico, sendo que, após o procedimento de coleta, os pacientes continuaram em atendimento e acompanhamento nas disciplinas correspondentes. Todos os procedimentos foram realizados nas dependências da Clínica Odontológica da Faculdade da Serra Gaúcha (FSG).

Procedimentos clínicos

Após realizado o diagnóstico dos dentes que apresentaram necrose pulpar sem ou com lesão periapical visível ao exame radiográfico (grupos 1 e 2 respectivamente), foi feito isolamento absoluto do dente. O acesso à cavidade pulpar foi realizado com brocas esféricas em alta rotação com refrigeração. A coleta de amostra foi realizada com limas endodônticas #15¹ estéreis, que foram introduzidas no canal radicular até o 2mm aquém do comprimento aparente, determinado através de radiografia periapical prévia, e tracionadas contra as paredes do conduto.

Procedimentos microbiológicos

Após o tecido necrosado ser coletado, a lima endodôntica foi acondicionada em um tubo de ensaio contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion), estes tubos foram enviados ao Laboratório de Microbiologia e Patologia Bucal da FSG, onde foram incubados em aerobiose a uma temperatura de

¹ Dentsply Maillefer, Catanduva, Brasil.

37°C por 48 horas. Durante este período de tempo, os tubos foram triados quanto à turbidez observada a partir do crescimento bacteriano do caldo.

Para o processo de identificação bacteriana, após as 48 horas da incubação inicial, uma alíquota de 0,5ml de inóculo do caldo BHI foi semeada em placa de Petri contendo Ágar BHI e novamente incubada em aerobiose por 48h.

Para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) foi utilizado uma solução mãe a partir da escala de 0,5 de McFarland. Logo após o ajuste da concentração, uma alíquota de 50µl pertencente à diluição de 10⁴ foi utilizada para semeadura em placa de Petri com Ágar BHI e incubada em aerobiose por 48h.

Análise de dados

Após a obtenção dos dados, os mesmos foram analisados utilizando o programa Graphpad Prism 6¹. Diferenças na prevalência das diferentes espécies dentro das coletas foram comparadas por meio do teste de frequência relativa e absoluta para dados nominais. Para testar a hipótese nula de relação entre as espécies foi utilizado o teste *t* não pareado. Para análise da diferença estatística foi utilizado *p* valor de 0,05 com 95% de intervalo de confiança.

RESULTADOS

Os achados foram obtidos através da coleta de 12 canais radiculares infectados sendo 3 sem lesão periapical (Grupo 1) e 9 com lesão periapical visível radiograficamente (Grupo 2).

A distribuição dos achados microbiológicos está apresentada na Tabela 1. No Grupo 1 obtivemos uma menor variedade de espécies microbiológicas cultiváveis quando comparado com os achados para o Grupo 2. Quanto a contabilização de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL), obtivemos uma diferença significativa (*p*<0,01) entre os grupos sem e com lesão periapical, sendo que o Grupo 1, embora tenha apresentado uma menor variedade bacteriana, teve um maior número de bactérias enquanto o Grupo 2 apresentou uma

variedade maior de microorganismos cultiváveis, porém estes encontravam-se em menor quantidade dentro do canal radicular (Figura 1).

Tabela 1 - Identificação das bactérias segundo os grupos, tipo e coloração Gram.

Grupo	Microorganismo	Tipo / Gram
G1	<i>Streptococcus oralis</i>	Cocos gram-negativos
Sem Lesão (n=3)	<i>Neisseria mucosa</i>	Microorganismo sugestivo de anaeróbio*
G2	<i>Campylobacter</i> spp	Cocos gram-negativos
Com Lesão (n=9)	<i>Candida</i> spp.	Cocos gram-positivos
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Bastonetes gram-negativos
	<i>Neisseria mucosa</i>	Espiroquetas gram-negativas
	<i>Streptococcus sanguis</i>	Leveduras
	<i>Streptococcus</i> spp.	
	<i>Treponema denticola</i>	
	Microorganismo sugestivo de anaeróbio*	

*Não foi possível realizar identificação conclusiva da cepa.

Unidade Formadora de Colônias por mL de microrganismos isolados a partir de infecções endodônticas na Clínica de Odontologia da FSG (UFC/mL)

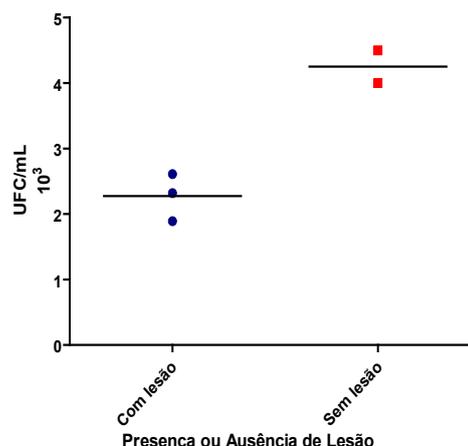


Figura 1 - Gráfico de UFC/por mL por grupo (*p*<0,05).

DISCUSSÃO

A doença endodôntica é uma infecção mediada por um biofilme bacteriano sendo que sua eliminação do sistema de canais radicular é o principal objetivo do tratamento endodôntico^{12,13} e a compreensão dos agentes microbiológicos envolvidos nas diferentes etapas da doença é de fundamental importância¹⁰. Dessa forma, a identificação completa do microbioma endodôntico é um passo importante para a compreensão das mudanças microecológicas que levam, por exemplo, a agudização dos quadros infecciosos¹⁴. Nos últimos anos, diversos

¹ GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA

estudos vêm sendo realizados justamente para tentar avaliar e identificar a microbiota endodôntica em diferentes condições clínicas e histopatológicas (necrose pulpar, abscessos periapicais agudos e crônicos, granulomas, cistos, entre outros)^{3,5,6,8,9,15-20}.

Um número significativo de parâmetros microecológicos podem determinar o estabelecimento de um biofilme bacteriano específico em um determinado nicho da cavidade oral, estes fatores incluem o pH local, pressão parcial ou abundante de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e o estado da resposta imune local do hospedeiro²¹. Além disso, o grau de severidade de uma infecção endodôntica está relacionado não só à presença de microorganismos mas ao número desses microorganismos no sítio infectado^{2,5,22}, sendo possível que algumas associações bacterianas possam resultar numa comunidade polimicrobiana mais virulenta^{5,6,23}. No presente estudo observamos uma diferença significativa entre as UFC/mL entre os dois grupos de estudo, o que pode indicar, como consideram Sundqvist⁷ e Nair³, uma mudança no perfil microbiológico da flora endodôntica conforme a doença avança, com a diminuição do número de microorganismos e/ou espécies aeróbias estritas e facultativas e aumento das anaeróbias estritas.

Segundo Siqueira²⁴ e em concordância com nossos resultados, as infecções primárias são, de maneira geral, infecções mistas constituídas principalmente de bactérias anaeróbias (predominantemente do gênero *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Campylobacter*) e onde estreptococos facultativos ou microaerófilos também são comumente encontrados. Já Nair^{3,25} afirma que a composição da microbiota endodôntica pode variar muito, sendo que os principais microorganismos encontrados são cocos gram-positivos do gênero *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Peptostreptococcus*, cocos gram-negativos do gênero *Neisseria* e *Veillonella*, bacilos gram-positivos do gênero *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Propionibacterium* e bacilos Gram-negativos do gênero *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Treponema* e *Campylobacter*, o que também concorda com nossos achados.

De todos os microorganismos citados, o *Enterococcus faecalis* (identificado em nosso estudo no grupo 2) é um dos principais, sendo comumente relacionado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico²⁶, já que é um patógeno com capacidade de sobreviver em ambientes com baixa quantidade de nutrientes e mesmo após o tratamento endodôntico²⁷, sendo que alguns pesquisadores vêm utilizando esta bactéria como base de estudo para o desenvolvimento de novas técnicas de desinfecção do canal radicular ou de novas medicações intracanaís a fim de aumentar as chances de eliminação deste microorganismo^{28,29}. Quanto à diversidade de espécies microbianas encontradas no biofilme endodôntico, em dentes com lesão periapical, Siqueira e colaboradores³⁰ identificaram 10 filos, 84 gêneros e 187 espécies; Özok e colaboradores³¹ identificaram 24 filos, 317 gêneros e 606 espécies; Li e colaboradores³² identificaram 13 filos e 179 gêneros. Essas diferenças de conteúdo microbiológico endodôntico observada entre os estudos pode se dar pelas diferenças entre dentes escolhidos, metodologias de coleta e cultivo, localização geográfica (qual parte do sistema de canais radiculares), técnicas de identificação (convencionais ou moleculares) e bases de dados usadas para a identificação bacteriana^{33,34}.

Devemos ainda considerar que a microbiota endodôntica normalmente muda conforme o tempo da infecção³ e pode diferir também de acordo com o tipo de doença periapical, sendo que uma maior variedade de espécies bacterianas pode estar associada a lesões periapicais crônicas e um grupo mais reduzido pode estar associado com doenças periapicais sintomáticas como a periodontite apical aguda e o abscesso periapical agudo^{35,36}, o que está de acordo com os achados de nosso estudo onde encontramos uma maior variedade de espécies bacterianas cultiváveis no grupo dos dentes com lesão periapical. Vale ressaltar ainda que as mudanças de microbiota também podem estar associadas às mudanças da resposta imune no canal radicular e região periapical. Por esta razão, as amostras endodônticas obtidas para análise microbiológica devem também ser avaliadas quando a seu perfil de mediador inflamatório¹⁴.

Entretanto, é importante salientar que a grande limitação deste estudo está no método de cultivo em aerobiose e ao número reduzido de amostras, o que restringiu nossos achados à microrganismos aerófilos estritos e anaeróbios facultativos. Atualmente existem diversas técnicas de cultivo e identificação microbiana, sendo os métodos moleculares, como os que utilizam *Polimerase Chain Reaction* (PCR), os mais precisos^{16,37}. Todavia, quando se utiliza estes métodos moleculares é importante avaliar não só a presença de determinada espécie bacteriana mas também a quantidade de células na amostra a fim de associar com os sinais e sintomas clínicos. Infelizmente, até hoje não existe um único método capaz de coletar e quantificar todos os microrganismos encontrados no espaço pulpar e estruturas relacionadas¹⁷.

Portanto, com o avanço das técnicas moleculares de identificação bacteriana, mais estudos se fazem necessários para o conhecimento cada vez mais aprofundado da microbiota endodôntica, principalmente buscando sua associação aos diferentes sinais e sintomas clínicos.

CONCLUSÃO

Com o presente estudo pudemos concluir que dentes com infecções endodônticas primárias (dentes com e sem lesão periapical) apresentam uma rica microbiota endodôntica. Inicialmente a infecção endodôntica é constituída de uma grande variedade de espécies bacterianas e um maior número de microrganismos aeróbios estritos e anaeróbios facultativos. Entretanto conforme a doença avança ocorrem mudanças ambientais que acarretam alterações no biofilme endodôntico, com a diminuição da quantidade de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos e da variedade de espécies bacterianas, com a predominância de microrganismos anaeróbios estritos.

REFERÊNCIAS

- 1- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in *germ-free* and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965; 20(3): 340-349.
- 2- Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dental tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13(2): 171-183.
- 3- Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failure. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15(6): 348-381.
- 4- Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canals. Endod Topics 2003; 6(1): 3-28.
- 5- Siqueira JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. Braz Dent J 2007; 18(4): 267-280.
- 6- Drucker DB, Natsiou I. Microbial ecology of the dental root canal. Microbial Ecology in Health and Disease 2000; 12(2): 160-169.
- 7- Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78(4): 522-530.
- 8- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Souza ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 2004; 19(2): 71-76.
- 9- Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97(5): 632-641.
- 10- Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS. A prognostic model for assessment of the outcome of endodontic treatment: effect of biologic and diagnostic variables. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 9(3): 342-352.
- 11- Siqueira JF, Lopes HP. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.
- 12- Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit. Endod Topics 2002; 1(1):40-53.

- 13- Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015; 5(1): 1-12.
- 14- Zehnder M, Belibasakis GN. On the dynamics of root canal infections – what we understand and what we don't. *Virulence* 2015; 6(3): 216-222.
- 15- Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(2): 231-252.
- 16- Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-Based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3223-3231.
- 17- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(2): 71-76.
- 18- Sassone LM, Fidel RA, Favari M, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of unexposed and exposed pulp space of primary endodontic infections by Checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod* 2012; 38(7): 889-893.
- 19- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36(1): 1-11.
- 20- Saber MH, Schwarzberg K, Alonaizan F A, Kelley ST, Sedghizadeh PP, Furlan M, et al. Bacterial flora of dental periradicular lesions analyzed by the 454-pyrosequencing technology. *J Endod* 2012; 38(11): 1484-1488.
- 21- Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl 11): 28-35.
- 22- Jung IY, Choi BK., Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ, et al. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92(3): 329-334.
- 23- Rôças IN, Siqueira JF, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod* 2011; 37(9): 1206-1212.
- 24- Siqueira JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002; 94(3): 281-293.
- 25- Nair, PNR. Apical periodontitis: a dynamics encounter between root canal infection and host response. *Periodontology* 2000 1997; 13(2): 121-148.
- 26- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35(3): 221–228.
- 27- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owitz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod* 2006; 32(2): 93-98.
- 28- Wagner C, Barth VC, de Oliveira SD, Campos MM. Effectiveness of the Proton Pump Inhibitor Omeprazole Associated with Calcium Hydroxide as Intracanal Medication: An In Vivo Study *J Endod* 2011; 37(9): 1253-1257.

- 29- Kobayashi Y, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Ibi H, et al. Passive ultrasonic irrigation in the presence of a low concentration of hydrogen peroxide enhances hydroxyl radical generation and bactericidal effect against *Enterococcus faecalis*. J Oral Sci 2014; 56(1): 35-39.
- 30- Siqueira JF, Alves FR, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of apical root canal microbiota. J Endod 2011; 37(11):1499-14503.
- 31- Özok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJJ, Wesselink PR, Crielaard W, et al. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. Int Endod J 2012; 45(6): 530-541.
- 32- Li L, Hsiao WWL, Nandakumar R, Barbutto SM, Mongodin EF, Paster BJ, et al. Analysing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. J Dent Res 2010; 89(9): 980-984.
- 33- Baumgartner JC, Siqueira JF, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. J Endod 2004; 30(3): 141-144.
- 34- Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res 2009; 88(11): 969-981.
- 35- Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR, Coelho AM, de Janeiro R. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91(4): 468-471.
- 36- Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92(4): 451-457.
- 37- Alves, FRF Compreendendo a etiologia microbiana das infecções endodônticas. Rev Biociên 2004; 10(1-2); 67-71.

***Autor para correspondência:**

Cláudia Wagner

E-mail: claudia.wagner@fsg.br