**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**
**MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

**WEDERSON TAVARES FURTADO**

# IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM INFECÇÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS PÓS-TERAPIA ENDODÔNTICA

VITÓRIA
2014

WEDERSON TAVARES FURTADO

# IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM INFECÇÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS PÓS-TERAPIA ENDODÔNTICA

Relatório para apresentação de Qualificação e defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientador: Prof[a] Dr[a] Rosana de Souza Pereira.

VITÓRIA

2014

# DEDICATÓRIA

A Deus, luz da minha fé

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir essa conquista, mesmo nos momentos de tristeza e de pouca fé, mesmo que Graças sejam dadas a todo momento.

A todos que contribuíram e possibilitaram a conclusão de mais esta etapa em minha vida.

Aos meus pais, Luziane e Ogenilton, pelo exemplo de fé, força e perseverança na vida e por toda a educação a que me foi dada. Aos meus irmãos pelo incentivo.

À professora Rosana de Souza Pereira por ter confiado em mim desde o início do Mestrado, por toda sua disponibilidade, paciência e simplicidade.

Aos amigos que fiz no Mestrado, por todo o aprendizado, por não me deixar desistir diante das dificuldades e tornar nossa caminhada menos árdua.

Ao Professor Mario Julio Avila Campos e todos os colegas que fiz no Laboratório de Anaeróbios da Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por me cederem espaço, profundos conhecimentos e seriedade nas pesquisas.

Ao Dr. Eudes Gondim e à Simony Kataoka pela receptividade em São Paulo.

Ao Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo por ter possibilitado a conclusão deste curso.

À Universidade Federal do Espírito Santo, instituição tanto sonhada.

Ao Ministério da Educação pelo cooperação interinstitucional e pelo apoio financeiro.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

# RESUMO

Visando o controle da infecção em Endodontia, muitas vezes não alcançado de maneira satisfatória, perpetuando processos patológicos mesmo após a terapia endodôntica, coletamos, por cirurgia parendodôntica, a porção mais apical (tecido duro) e tecido mole circunjacente de dentes portadores de infecções periapicais crônicas pós-terapia endodôntica e nos propusemos a identificar e quantificar três microrganismos, *Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nesses sítios. As amostras de tecido mole e de tecido duro para cada paciente foram acondicionadas separadamente, trituradas por meio de alicates ortodônticos, tiveram seu material genético extraído e submetido ao método da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real pelo sistema *SYBR Green*. Todos os pacientes (n=30) apresentaram ao menos um dos microrganismos em um dos dois sítios avaliados. *F. nucleatum* foi o microrganismo mais presente, em 21 amostras de tecido mole (70,0%) e 22 de tecido duro (73,3%) apresentando também a maior média de número de cópias, 1,12E+06 para o tecido mole e 1,33E+04 para o tecido duro para cada paciente, seguido pelo *A. actinomycetemcomitans,* que esteve presente em 08 amostras de tecido mole (26,6%) e em 07 de tecido duro (23,3%), com média de número de cópias de 5,82E+03 para o tecido mole e 5,70E+02 para o tecido duro. A menor prevalência e a menor média de número de cópias avaliadas foram do *P. gingivalis,* identificado em 04 amostras de tecido mole (13,3%) e em 05 de tecido duro (16,6%) com 4,67E+02 e 6,00E+01, respectivamente. Concluímos que a presença de microrganismos em lesões periapicais pós-tratamento endodôntico tem sido subestimada tanto com relação à presença quanto à espécie bacteriana precisando de elucidações adicionais, no sentido de poder combater e neutralizar a infecção periapical.

Descritores: Periodontite Periapical, Endodontia; Reação em Cadeia da Polimerase.

# ABSTRACT

For the control of infection in Endodontics, often not satisfactorily achieved perpetuating pathological processes after endodontic therapy, collected by endodontic surgery, the apex (hard tissue) and surrounding soft tissue of teeth with chronic periapical endodontic infections after therapy and we set out to identify and quantify three microorganisms *Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* these sites. The samples of soft tissue and hard tissue for each patient were packed separately ground by means of orthodontic pliers, had their genetic material extracted and subjected to the reaction method Polymerase Chain in Real Time by *SYBR Green* system. All patients (n = 30) had at least one microorganism in one of the two sites. *F. nucleatum* was the most microorganism present, 21 samples of soft tissue (70.0%) and 22 hard tissue (73.3%) also showing the highest average number of copies, 1.12E +06 for soft tissue and 1.33E +04 for hard tissue for each patient, followed by *A. actinomycetemcomitans*, which was present in 08 samples of soft tissue (26.6%) and 07 hard tissue (23.3%), with a mean copy number of 5.82 E +03 for soft tissue and 5.70E +02 for hard tissue. The lower prevalence and lower average number of copies were evaluated P. gingivalis identified in 04 specimens of soft tissue (13.3%) and hard tissue in 05 (16.6%) with 4.67E+02 and 6.00E +02 E +01, respectively. We conclude that the presence of microorganisms in endodontic post-treatment periapical lesions has been underestimated relative to both the presence and the bacterial species needing additional clarifications in order to be able to combat and neutralize periapical infection.


Key-words: Periapical Periodontitis, Endodontics, Polymerase Chain Reaction.

# LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1 - Esquema ilustrativo que visa demonstrar os sistemas *TaqMan e SYBR Green* da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*q*PCR) .....17**

**FIGURA 2 - Tecidos duro e mole obtidos por procedimento cirúrgico acondicionados em tubos plásticos ..... 22**

**FIGURA 3 - Maceração de espécime de tecido duro, por meio de alicate ortodôntico, contido em placa de Petri ..... 22**

**FIGURA 4 - Maceração de espécime de tecido mole, por meio de alicate ortodôntico, contido em placa de Petri ..... 23**

**FIGURA 5 - Kit empregado para a extração do material genético ..... 23**

**FIGURA 6 - Reagentes empregados na reação de qPCR ..... 24**

**FIGURA 7 - Rotor Gene 6000 conectado a um computador que permite a interpretação em dados numéricos a captação da fluorescência emitida pelo fluorocromo ..... 26**

# LISTA DE TABELAS

**TABELA 1 – Microrganismos identificados e quantificados, *primers* e condições de ciclagem utilizadas na reação de qPCR ..... 25**

**TABELA 2 – Espécies microbianas detectadas nos pacientes do estudo ..... 28**

**TABELA 3 - Número de cópias dos microrganismo para cada paciente ..... 29**

**TABELA 4 - Total de cópias de microrganismo diagnosticadas nos sítios estudados ..... 30**

**TABELA 5 – Correlação entre tecidos mole e duro ..... 31**

**TABELA 6 - Associação entre microrganismos de tecido mole e duro ..... 32**

# SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO ..... 9**
**2. REVISÃO DA LITERATURA ..... 11**
2.1. A infecção em Endodontia ..... 11
2.2. PCR: importante ferramenta de Biologia Molecular para a Endodontia Contemporânea ..... 15
**3. OBJETIVOS ..... 19**
3.1. Objetivos gerais ..... 19
3.2. Objetivos específicos ..... 19
**4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 20**
4.1. Considerações a respeito da amostragem ..... 20
4.2. Critérios de inclusão e exclusão no estudo ..... 20
4.3. Seleção e coleta de amostras ..... 21
4.4. Preparo das amostras para extração de DNA bacteriano ..... 22
4.5. Determinação quantitativa por qPCR ..... 24
4.6. Cálculo de células teóricas pela qPCR ..... 26
**5. Resultados ..... 27**
**6. Discussão ..... 33**
**7. Conclusões ..... 42**
**8. Referências ..... 44**
**APÊNDICE A – ARTIGO ..... 50**
**APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....73**
**APÊNDICE C – VERIFICAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE PRIMERS ..... 75**