



FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI

**“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LESÕES  
PERIAPICAIS CRÔNICAS ASSOCIADAS AO INSUCESSO  
DO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO”**

PIRACICABA

2013





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI**

**“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LESÕES PERIAPICAIS  
CRÔNICAS ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO RETRATAMENTO  
ENDODÔNTICO”**

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Co-orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTORA EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA, NA  
ÁREA DE ENDODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da  
dissertação defendida pela aluna, e orientada pelo  
Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto.

---

Assinatura do orientador

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Si26a Signoretti, Fernanda Graziela Corrêa, 1979-  
Avaliação microbiológica de lesões periapicais crônicas  
associadas ao insucesso do retratamento endodôntico  
/ Fernanda Graziela Correa Signoretti. -- Piracicaba, SP : [s.n.],  
2013.

Orientador: Rogério de Castilho Jacinto.  
Coorientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Apicectomia. 2. Endodontia. 3. Microbiologia. 4. Cistos. 5.  
Granuloma. I. Jacinto, Rogério de Castilho. II. Gomes, Brenda  
Paula Figueiredo de Almeida, 1961- III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Microbiological evaluation of chronic periapical lesions  
associated with unsuccessful endodontic retreatment

**Palavras-chave em Inglês:**

Apicoectomy

Endodontics

Microbiology

Cysts

Granuloma

**Área de concentração:** Endodontia

**Titulação:** Doutora em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Rogério de Castilho Jacinto [Orientador]

Helena Rosa Campos Rabang

Vanessa Bellocchio Berber Haddad

Caio Cezar Randi Ferraz

Adriana de Jesus Soares

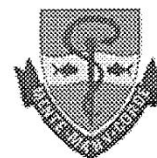
**Data da defesa:** 22-01-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 22 de Janeiro de 2013, considerou a candidata FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI aprovada.

Prof. Dr. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO

Profa. Dra. HELENA ROSA CAMPOS RABANG

Profa. Dra. VANESSA BELLOCCHIO BERBER HADDAD

Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Profa. Dra. ADRIANA DE JESUS SOARES



Dedico este trabalho aos meus pais, **Roque e Zélia**, por sempre terem sido minha inspiração e nunca medirem esforços para tornarem meus sonhos realidade.

Aos meus irmãos, **André Gustavo e João José**, pelo companheirismo, cuidado e amizade incondicional.



A **Deus**, antes de tudo, que sempre me ilumina, me protege e me dá forças para encarar cada dia como um novo começo.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto**, pelos ensinamentos imprescindíveis para minha formação acadêmica, pelos conselhos nas horas difíceis, pelos momentos maravilhosos proporcionados pela nossa convivência, pelo apoio contínuo e incondicional mesmo quando estive distante, por ser um exemplo de caráter e profissionalismo, e pela amizade que nos uniu há muito tempo e só se fortalece a cada dia.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, por não ter medido esforços para que fosse possível a realização deste trabalho dando retaguarda em todos os momentos que precisei, por continuar sendo um exemplo de dedicação e competência profissional e acima de tudo por ter me apresentado com nossa amizade, que espero manter ao longo dos anos.

I would like to express my deep and sincere gratitude to **Dr. Christine M. Sedgley** (MDS, MDSc, FRACDS, MRACDS (Endo), PhD; Associate Professor and Chair of Endodontology; Oregon Health & Science University; Portland, OR, USA) for having me as Visitor Scientist during my Post-graduate course in her Laboratory. Foremost, for sharing such outstanding moments with her lovely family: Victor and Porsche. Her understanding, encouraging and personal guidance were essential during my time in Portland.

I warmly thank **Dr. Curtis A. Machida** (PhD; Professor, Integrative Biosciences and Pediatric Dentistry; Oregon Health & Science University) for not only giving me the opportunity to work in his laboratories but also being a great and reachable mentor.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Aos professores da área de Endodontia **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz**, **Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho** e **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de bolsas no Programa de Doutorado no país (PROEX) e no Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDDE), Processo BEX: 3679/10-1.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Altair Antoninha Del Bel Cury**, **Alan Roger**, **Célia Marisa Rizzatti Barbosa**, **Cinthia Machado Tabchoury**, **Débora Alves Nunes Leite Lima**, **Eduardo Dias de Andrade**, **Flávio Henrique Baggio Aguiar**, **Francisco Carlos Groppo**, **Glaucia Maria Ambrosano**, **José Ricardo de Albergaria Barbosa**, **José Roberto Lovadino**, **Lívia Tenuta**, **Luciana Asprino**, **Luís Alexandre Paulillo**, **Luís Roberto Marcondes**, **Márcio Casati**, **Márcio de Moraes**, **Maria Cristina Volpato**, **Pedro**

**Luiz Rosalen, Renata Cunha Matheus, Wander José da Silva**, pela admiração e convívio agradável durante minha vida acadêmica em Piracicaba.

A todos os colegas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que participaram da minha vida acadêmica: **Adriana de Jesus Soares, Adriano Lima, Ana Carolina Machado Rocha Lima Caiado, Camila Lima, Carlos Vieira Júnior, Cícero Gade Romão-Neto, Danna Mota Moreira, Douglas Cecchin, Ericka Tavares Pinheiro, Estela Winocur, Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Ezymar Cayana, Flaviana Bombarda de Andrade, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Helena Rosa Campos Rabang, Joelson Brum, Juliana Santos, Juliana Melo, Juliana Nunes Botelho, Karine Schell Nicastro, Luciana Almeida, Maraísa Greggio Delboni, Marcos Endo, Marcos Frozoni, Maria Eunice Davidian, Maria Malerba C. Humel, Mirella Lindoso Gomes Campos, Morgana Vianna, Naelka Sarmento, Neylla Teixeira Senna, Noboru Imura, Patrick Baltieri, Paulo Hemerson de Moraes, Priscila Camondy Bertaglia, Ricardo Ferreira, Rogério de Castilho Jacinto, Shaiana Tashi Kawagoe, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Bellato, Vanessa Berber, e Wanderson Miguel Maia Chiesa**, pelo aprendizado e convívio agradável compartilhado nesses anos.

A todos os alunos que passaram pelo Curso de Especialização em Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, desde o ano de 2007, pelos momentos de aprendizado e comemorações.

Aos colegas de mestrado **Ana Carolina Pimentel, Aniele Lacerda, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Cimara Barroso Braga Brum, Claudia Suzuki, Érika Clavijo, Thais Duque, Thiago Farias e Tiago Rosa**.

Aos colegas de doutorado **Ana Carolina Mascarenhas, Carlos Pantoja, Carolina Carvalho de Oliveira, Daniel Rodrigo Herrera, Daniela Miyagaki, Emmanuel da Silva, Gabriel Rocha Campos, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Jefferson**

**Marion, Juliana Nagata, Letícia Nóbrega, Marcos Sérgio Endo, Máira Prado, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro e Nilton Vivacqua Gomes.**

Aos funcionários **Ana Godoy, Daiane Scutton, Denize Lumena de Pinho, Geovânia Caldas Almeida, Eliane Melo Franco de Souza, Eliene Narvaes, Helídia Maria, Maria Elisa dos Santos** e os ex-funcionários **Adailton dos Santos Lima e Wanderly Almeida Pavinatto.**

À **Érica A. Pinho Sinhoreti, Priscilla Zuzi Boldrin, Raquel Q. Marcondes Cesar, Roberta Clares Morales dos Santos, Débora Barbeiro e Ana Paula Carone**, profissionais da Secretaria da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Aos Professores **Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Dra. Vanessa Bellocchio Berber Haddad, Dra. Helena Rosa Campos Rabang, Dra. Adriana de Jesus Soares, Dr. Francisco Montagner, Dr. Frederico Canato Martinho e Dra. Thaís Accorsi Mendonça** que aceitaram prontamente o convite para compor a Banca Examinadora deste trabalho. A cada um de vocês devo parte da minha formação acadêmica, clínica e pessoal. Obrigada pela dedicação através dos anos.

Aos pacientes que colaboraram e possibilitaram a realização da pesquisa.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.



Ao meu primo **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, por me deixar extremamente orgulhosa de sua competência profissional e pessoal, sendo extensivamente reconhecido e extremamente admirado por colegas, alunos e funcionários dentro e fora desta instituição.

A todos os meus familiares por terem dado sempre suporte e torcido tanto pelo meu sucesso ao longo dos anos.

Aos queridos membros da Liga, **John V. Veasey, Débora C. Almeida Barra e Cássio A. S. Siqueira Junior**, por me ensinarem o verdadeiro significado de irmandade e por provarem que “para sempre” existe.

Às estimadas amigas de graduação **Cecília, Fernanda, Luciana e Melina**, pela amizade mais pura e verdadeira que se mantém intacta através dos anos.

À **Vivian Sayuri Kitayama** pela amizade mais linda, pelas palavras de incentivo, admiração e carinho... e por ter sido um ser humano superior ao dividir o Marcos conosco por tanto tempo.

À **Fernanda Pelógia Gwiner**, pela calorosa acolhida, pelos cafés sensacionais, por ter me ensinado tanto sobre tanta coisa em tão pouco tempo, por ter me mostrado “Portlandia” e, acima de tudo, por ter sido meu porto seguro e minha família quando a solidão realmente pesou.

Aos grandes amigos que um dia fiz graças ao Laboratório da área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba: **Ariane Cássia Salustiano Marinho, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Marcos Sérgio Endo, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro,**

**Morgana Eli Vianna, Shaiana Kawagoe e Thais Accorsi Mendonça...** Depois de longos anos da mais prazerosa convivência, almoços em lugares glamorosos ou no requinte do “bandejão”; madrugadas produtivas no laboratório; confidências e desabafos; piadas para aliviar a tensão e abraços apertados em dias difíceis; mas acima de tudo, muita, mas muita risada e aquele bem-estar que só sentimos quando estamos entre pessoas que nos querem bem... Deixo a vocês meu mais sincero: Muito obrigada!

À **Mari Franciosi**, pelo simples fato de ter tornado cada um dos meus dias mais fáceis.

Aos meus queridos amigos caninos: **Tite, Lenny, Teka, Joe, Externo e Chanel** (agregada)... Um olhar amoroso, um pedido de carinho, um rabinho abanando enlouquecidamente... Quantas vezes isso era tudo que eu precisava no final do dia!

A todos que participaram de forma direta e indireta, contribuindo para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O conhecimento do perfil microbiano envolvido na periodontite apical persistente pode auxiliar no estabelecimento de protocolos mais eficazes na conduta endodôntica. Através de um relato de caso clínico e da avaliação de 20 casos de periodontite apical persistente após retratamento endodôntico, foram objetivos deste trabalho: identificar bactérias viáveis em lesões periapicais persistentes e correlacionar os achados microbiológicos com o diagnóstico histopatológico da lesão. Métodos: No relato de caso o dente foi submetido ao retratamento endodôntico através da técnica de crown-down com o uso de substância química auxiliar (clorexidina 2% gel), patência e alargamento foraminal e obturação dos canais em sessão única. Após persistência da fístula foi indicada apicectomia, que foi realizada sob magnificação e retro-obturação com MTA. O fragmento apical da raiz distal foi observado por microscopia eletrônica de varredura e foi realizada cultura microbiana da lesão curetada (**capítulo 1**). Foram selecionados 20 pacientes com necessidade de cirurgia parendodôntica, submetidos à coleta durante a curetagem do tecido periapical. As amostras foram processadas microbiologicamente por técnicas de cultura microbiana e enviadas para diagnóstico histológico (**capítulo 2**). Resultados: No **capítulo 1** as seguintes espécies foram encontradas: *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra* e *Bacteroides ureolyticus*; a análise em microscopia eletrônica de varredura revelou biofilme bacteriano circundante ao forame apical e superfície radicular externa. O trespasse de guta-percha no zip apical causado durante o primeiro tratamento também foi observado. A preservação radiográfica após seis meses mostrou reparo periapical aparente, o qual foi confirmado após 24 meses. No **capítulo 2** foram encontrados mais cistos (13/20) do que granulomas (7/20). A cultura microbiológica e testes bioquímicos específicos puderam identificar 83 bactérias cultiváveis divididas em 33 espécies bacterianas distintas. As lesões demonstraram uma infecção de caráter misto, composta em sua maior parte por

microrganismos anaeróbios estritos (80,4% em cistos e 65% em granulomas) e Gram-positivos (70,6% em cistos e 84,4% em granulomas). Embora se tenha isolado até sete espécies bacterianas em uma única lesão (granuloma), na maioria dos casos, quatro (25%) ou cinco (35%) espécies foram encontradas simultaneamente. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste exato de Fisher e chi-quadrado de Pearson ( $P < .05$ ). Conclusões: Bactérias Gram-positivas anaeróbias estritas e o biofilme extrarradicular parecem participar da etiologia do insucesso do tratamento endodôntico. O retratamento endodôntico seguido de microcirurgia periapical constitui uma alternativa de sucesso na resolução de infecções extrarradiculares persistentes (**capítulo 1**). Embora os cistos tenham sido mais frequentes que granulomas nos casos de insucesso do retratamento endodôntico, bactérias foram isoladas em ambos os tipos de lesão, com uma predominância de espécies gram-positivas, sugerindo que as mesmas são capazes de sobreviver fora do canal radicular e podem estar relacionadas com a persistência do processo patológico, mesmo após um retratamento endodôntico acurado (**capítulo 2**).

**Palavras-chave:** Apicectomia, endodontia, microbiologia, cistos, granuloma.

## ABSTRACT

The knowledge of the microbial profile of persistent apical periodontitis allows the development of more efficient endodontic therapy. Through the evaluation of a case report and 20 cases of persistent apical periodontitis after endodontic retreatment, the objectives of this study were: to identify viable bacteria in persistent periapical lesions and correlate microbiological findings with histopathological diagnosis. Methods: In the case report, the tooth had undergone endodontic retreatment by the crown-down technique with the use of auxiliary chemical substance (2% chlorhexidine gel), foraminal patency and enlargement and filling of root canals in a single session. After persistence of sinus tract apicoectomy was indicated, which was performed under magnification and retro-filled with MTA. Apical fragment of the distal root was observed by scanning electron microscopy and excised tissue processed for microbial identification (**Chapter 1**). Twenty patients requiring endodontic surgery were selected. The samples were processed by microbiological techniques from microbial culture and sent for histological diagnosis (**Chapter 2**). Results: In **chapter 1** the following species were found: *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *botullinum Clostridium*, *Parvimonas micra* and *Bacteroides ureolyticus*; SEM analysis of the root end showed bacterial biofilm surrounding the apical foramen and external root surface. Gutta-percha in the apical zip caused during the first treatment was also observed. Six months follow-up showed apparent periapical repair, which was confirmed after 24 months. In **chapter 2** more cysts (13/20) than granulomas (7/20) were found. Culture tests were able to identify 83 specific cultivable bacteria divided into 33 different bacterial species. The microbial characterization showed a mixed infection, composed mostly by strict anaerobes (80.4% in cysts and granulomas in 65%) and gram-positive (70.6% in cysts and granulomas in 84.4%). Although up to seven bacterial species in a single lesion (granuloma) has been isolated, in most cases, four (25%) or five (35%) species have been found. Data were statistically analyzed

using Fisher's exact test and Pearson chi-square test ( $P < .05$ ). Conclusions: Gram-positive bacteria and extra-radicular biofilms seem to participate in the etiology of endodontic retreatment failure. The endodontic retreatment followed by micro-periapical surgery proved to be a successful alternative in the resolution of extra-root persistent infections (**Chapter 1**). Although cysts were more frequent than granulomas in cases of failure of the endodontic retreatment, bacteria were isolated from both types of lesions, with a predominance of gram-positive species, suggesting that these species can survive outside the root canal and might be related with the persistence of the pathological process even after accurate endodontic retreatment (**Chapter 2**).

**Key words:** Apicoectomy, endodontics, microbiology, cysts, granuloma.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                    | 1   |
| CAPÍTULO 1 - Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: SEM analysis and microbial investigation after apical microsurgery ..... | 7   |
| CAPÍTULO 2 - Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with chronic apical periodontitis .....        | 29  |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS.....                                                                                                                                          | 47  |
| Justificativa da pesquisa .....                                                                                                                                    | 47  |
| Infecção endodôntica persistente .....                                                                                                                             | 47  |
| Diagnóstico histopatológico .....                                                                                                                                  | 51  |
| Cirurgia parendodôntica.....                                                                                                                                       | 52  |
| Material e Métodos utilizados .....                                                                                                                                | 53  |
| CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                    | 55  |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                  | 57  |
| APÊNDICE 1 - Material e métodos e ilustrações dos experimentos.....                                                                                                | 67  |
| APÊNDICE 2 – Meio de Transporte .....                                                                                                                              | 76  |
| APÊNDICE 3 – Meios de cultura .....                                                                                                                                | 83  |
| APÊNDICE 4 – Coloração de Gram .....                                                                                                                               | 91  |
| APÊNDICE 5 – Teste de Catalase .....                                                                                                                               | 95  |
| APÊNDICE 6 – Teste da Oxidase .....                                                                                                                                | 97  |
| APÊNDICE 7 – Kits de identificação microbiana .....                                                                                                                | 99  |
| APÊNDICE 8 – Produção bibliográfica da aluna .....                                                                                                                 | 109 |
| ANEXO - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa .....                                                                                                           | 111 |





## 1. INTRODUÇÃO

Infecções endodônticas são doenças inflamatórias sintomáticas ou assintomáticas causadas por microrganismos presentes no sistema de canais radiculares (Siqueira, 2002). O preparo químico-mecânico do canal radicular reduz significativamente os microrganismos predominantes na microbiota endodôntica (Byström & Sundqvist, 1981; Peters *et al.*, 2002), porém mesmo após a limpeza, modelagem e obturação do sistema de canais radiculares, seguida de uma restauração satisfatória do elemento dental, um pequeno percentual dos casos mostra evidências de lesões apicais persistentes (Salehrabi & Rotstein, 2004).

A porcentagem de sucesso do retratamento endodôntico é questionável no sentido de estar diretamente ligada a causa da falha no tratamento anterior. Aqueles casos onde o preparo do sistema de canais simplesmente foi executado de forma inadequada, porém sem a ocorrência de iatrogenias que resultassem em regiões inacessíveis durante a nova intervenção, tenderia ao sucesso. Por outro lado, um tratamento realizado satisfatoriamente e que apresente insucesso, pode estar relacionado a presença de microrganismos que de alguma forma sobreviveram aos procedimentos de limpeza e modelagem e também as defesas do organismo, resultando na ocorrência de uma lesão periapical persistente.

Analisada de forma geral, a porcentagem de sucesso do tratamento endodôntico executado por um especialista situa-se acima de 90%, entretanto os números diferem quando são comparados tratamentos endodônticos iniciais (94%) e aqueles submetidos ao retratamento endodôntico não-cirúrgico, onde este percentual é reduzido para 85.9% (Imura *et al.*, 2007). O cenário no retratamento não-cirúrgico pode envolver remoção de retentores intrarradiculares, complexidades anatômicas inacessíveis, desvios, fraturas de instrumento, perfurações e qualquer outra situação que favoreça a permanência de

microrganismos presentes na infecção primária, resultando na redução do índice de sucesso.

Além disso, a presença de periodontite apical persistente no momento do tratamento endodôntico parece afetar negativamente a previsibilidade do tratamento, sugerindo que a persistência de bactérias não só no tecido intrarradicular, mas nos tecidos periapicais pode resultar em infecções refratárias ou recorrentes (Sjogren *et al.*, 1990; Abou-Rass & Bogen, 1998; Siqueira *et al.*, 2008). A forma com que os microrganismos colonizam o canal radicular permanecendo viáveis por longos períodos em ambiente desfavorável e multiplicando-se, é importante no que se refere à formação do biofilme apical, o qual pode estar relacionado com a perpetuação de infecções endodônticas (Siqueira, 2001).

A periodontite apical decorre da extensão da infecção presente no interior dos canais radiculares, representando uma resposta inflamatória dinâmica à presença de microrganismos nesta região (Nair, 2000). Estes microrganismos invadem os tecidos periapicais durante as fases de exacerbação do processo infeccioso e suas toxinas favorecem a formação de lacunas de reabsorção na superfície radicular externa, estabelecem-se assim nichos favoráveis à colonização microbiana (Lomçali *et al.*, 1996). Os microrganismos podem se organizar em comunidades complexas protegidas por uma camada de polissacarídeos, consolidando a formação de um biofilme apical (Ricucci & Siqueira, 2010).

Pesquisas anteriores, utilizando microscopia de luz e cultura, demonstravam que lesões periapicais conteriam uma carga microbiana não significativa, ou mesmo ausente (Block *et al.*, 1976; Walton *et al.*, 1992). No entanto ambas as técnicas apresentam limitações na detecção de bactérias, seja pelo uso de meios seletivos ou resistência do microrganismo ao corante.

A invasão do tecido periapical por células bacterianas viáveis é fundamental para o desenvolvimento da lesão periapical. Microrganismos localizados na porção apical do canal estão em posição estratégica para causar danos ao hospedeiro. Porém Kronfeld (1939) observou que independente da carga microbiana na luz do canal de um dente com lesão periapical, essas bactérias raramente eram encontradas no tecido granulomatoso periapical; sugerindo que um granuloma não é uma área na qual as bactérias vivem, mas onde são destruídas. Produtos ou componentes bacterianos podem ativar direta ou indiretamente o sistema imunológico do hospedeiro, levando a inflamação dos tecidos periapicais (Mattison *et al.*, 1987). O próprio evento inflamatório resulta num ambiente hostil, com uma exacerbação da resposta imune local, na tentativa de conter a invasão dos microrganismos.

Diante dessa situação, é sensato pensar que a microbiota capaz de invadir e se estabelecer nesse ambiente deve ser capaz de desenvolver mecanismos de adaptação como aderir aos tecidos, suportar um meio com alterações no potencial de óxido-redução e na demanda nutricional (Sutherland, 2001; Moreillon *et al.*, 2003).

Bactérias gram-positivas já foram frequentemente encontradas em amostras de canais radiculares em casos de insucesso endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003). Suas características estruturais como parede celular robusta e capacidade de expressar propriedades adaptativas quando expostas a ambientes nocivos as torna potencialmente interessantes como elementos causais na doença endodôntica pós-tratamento (Chavez de Paz, 2004).

Analisando o perfil microbiano de lesões apicais persistentes, Fujii *et al.* (2009) coletaram 20 amostras e analisaram através de métodos de cultura e sequenciamento. Foram isoladas 74 cepas pertencentes a 31 diferentes espécies,

com predominância de anaeróbios facultativos (51.6%), concluindo que a microbiota nestes casos é composta por diversos tipos de microrganismos com capacidade de formação de biofilme, incluindo *P. acnes*, *S. epidermidis* e *F. nucleatum*.

Biofilmes bacterianos têm sido detectados através de microscopia eletrônica de varredura nas porções apicais de dentes com lesões periapicais persistentes (Nair *et al.*, 1999). Organizadas dessa forma as bactérias são protegidas das defesas do hospedeiro e de antibióticos, e podem ser a fonte de infecções de difícil erradicação. Tais dados sugerem que biofilmes estabelecidos na porção apical, extrarradicular, não são removidos durante a terapia endodôntica não-cirúrgica e tem sido relatados como uma possível causa da periodontite apical pós-tratamento (Tronstad *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 2004).

Os microrganismos presentes no biofilme estão relacionados com a manutenção do processo infeccioso, enquanto que as células planctônicas podem exercer um papel importante em momentos de exacerbação da infecção (van Devanter & van Dalen, 2005).

Estudos *in situ* com microscopia ótica e/ou eletrônica têm demonstrado bactérias colonizando o sistema de canais radiculares em infecções primárias ou persistente/secundárias organizadas em biofilmes, recobrindo as paredes dentinárias (Nair, 1987; Siqueira *et al.*, 2002; Ricucci *et al.*, 2009; Carr *et al.*, 2009). Complexidades anatômicas como ramificações apicais, canais laterais, e istmos interligando canais principais costumam abrigar células bacterianas, que frequentemente estão organizadas em estruturas semelhantes a biofilmes (Nair *et al.*, 2005; Ricucci *et al.*, 2008; Ricucci *et al.*, 2010).

A presença de bactérias em lesões periapicais persistentes sugere que tal infecção tenha sua fonte de microrganismos no tecido periapical ou no biofilme

aderido a superfície radicular externa. Subramanian & Mickel (2009) demonstraram que lesões periapicais crônicas estão associadas a infecções polimicrobianas, onde podem estar presentes espécies bacterianas ainda não-cultiváveis ou mesmo desconhecidas, que talvez contribuam para o desenvolvimento e persistência de tais lesões. Bactérias foram encontradas em maior quantidade e com maior consistência nos ápices radiculares do que nas lesões. *Enterococcus faecalis* e *Burkholderia cepacia* predominaram e ambos os casos. *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus gordonii* foram associadas aos ápices radiculares, enquanto que *Atopobium rimae*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus genomospecies* C8, *Dialister sp* E2\_20 E1 e *Eubacterium* cepa A35MT foram associadas a lesões periapicais.

A correlação existente entre biofilme e lesões epitelizadas sugere que a periodontite apical persistente seja realmente uma patologia induzida por biofilme. Ricucci & Siqueira (2010) observaram biofilme em 77% dos canais radiculares (80% em canais não tratados; 74% em canais tratados), inclusive em istmos e ramificações. Sua ocorrência mostrou forte correlação com lesões epitelizadas (95% em cistos, 83% em abscessos e 69,5% em granulomas), porém nenhuma correlação significativa com sintomas clínicos ou presença de fístula. Era esperado que os biofilmes fossem encontrados com maior frequência associado a processos patológicos instalados há um período longo de tempo, como é o caso de lesões de grande diâmetro e cistos.

O conhecimento do perfil microbiano envolvido na periodontite apical persistente pode auxiliar no estabelecimento de protocolos mais eficazes na conduta endodôntica. As infecções estabelecidas no exterior do canal radicular podem não ser solucionadas pela terapia endodôntica ou mesmo pelo retratamento endodôntico. Nestes casos, a abordagem cirúrgica deve ser considerada.

Esta pesquisa foi dividida em dois capítulos, tendo como principais objetivos: descrever um caso clínico de periodontite apical persistente que teve sua resolução após retratamento endodôntico não-cirúrgico e cirurgia periapical (**capítulo 1**); identificar bactérias viáveis em lesões periapicais persistentes e correlacionar os achados microbiológicos com o diagnóstico histopatológico da lesão (**capítulo 2**).

## 2. CAPÍTULOS

### 2.1. Capítulo 1 - Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: SEM analysis and microbial investigation after apical microsurgery

#### ABSTRACT

**Introduction:** Procedural accidents have a negative effect on healing and might contribute to the persistence of infections in inaccessible apical areas, requiring surgical intervention. This report describes a case of persistent apical periodontitis of a lower left first molar associated with sinus tract and a periapical lesion that required nonsurgical endodontic retreatment and apical surgery for resolution.

**Methods:** The tooth had received endodontic treatment 3 years ago and had to be retreated using the crown-down technique with chemical auxiliary substance (2% chlorhexidine gel), foramen patency and enlargement and was filled in a single appointment. The occlusal access cavity was immediately restored with composite resin. After one month, it could be observed that the sinus tract persisted and, radiographically, the lesion remained unaltered. Therefore, endodontic microsurgery was indicated. Apical microsurgery was performed under magnification with the use of a dental operating microscope: apicectomy, root-end with ultrasound and sealing with MTA. A microbiological sample was collected from the apical lesion. The resected distal root apex was observed by scanning electron microscopy (SEM). **Results:** The following species were detected: *Actinomyces naeslundii* and *A. meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra* and *Bacteroides ureolyticus*; SEM analysis revealed bacterial biofilm surrounding the apical foramen and external radicular surface. Gutta-percha overfilling at the apex due to a zip caused during initial endodontic treatment could

be observed. A six-month follow-up showed apparent radiographic periapical healing, which progressed after 24 months. **Conclusion:** Gram-positive anaerobic bacteria and extraradicular biofilm seem to participate in the maintenance of persistent periapical pathology, and endodontic retreatment followed by periapical microsurgery proved to be a successful alternative in the resolution of persistent extraradicular infections.

**Key-words:** root canal infection; apical periodontitis; nonsurgical retreatment; endodontic failure; apical surgery; endodontic outcome.

## INTRODUCTION

Failure of nonsurgical root canal treatment is commonly related to the presence of residual bacteria (persistent infection) or to the reinfection of a previously disinfected root canal environment (secondary infection) (1). Unsuccessful outcomes can be attributed to persistent intraradicular infections found in previously uninstrumented canals, in dentinal tubules, or in the complex irregularities of the root canal system (2-4). The extraradicular causes of endodontic failures include: periapical actinomycosis (5), foreign body reaction caused by extruded endodontic materials (6), accumulation of endogenous cholesterol crystals in the apical tissues (7), and unresolved cystic lesion (8). Formerly treated teeth with persistent periapical lesions might be preserved with nonsurgical retreatment, assuming the tooth is restorable and periodontally sound. Previous procedural accidents have a negative effect on healing (9). Besides, they might contribute to the establishment of infections at inaccessible apical areas, requiring a surgical intervention (10).

Periradicular surgery is indicated in cases of unsuccessful outcomes after primary root canal therapy followed by nonsurgical retreatment. The goal of periradicular surgery is the removal of diseased periapical tissues and the sealing



of the apical root canal system to facilitate the regeneration of hard and soft tissues, including the formation of new attachment cells (11).

This clinical article reports a case of persistent apical periodontitis on the lower left first molar associated with a sinus tract, which was treated with nonsurgical endodontic retreatment and surgical procedures. This case report shows the limitations imposed by inadequate clinical procedures such as transportation and ledging of the main canals to achieve an adequate disinfection during first root canal treatment.

## **CASE REPORT**

A 38-year-old female patient was referred to the Endodontic Department of the University of Campinas complaining about a persistent sinus tract on the buccal alveolar mucosa associated with the distal apex of the lower left first molar. The patient did not report the presence of spontaneous pain. Periapical pathology could be observed in the preoperative radiograph. The dental history indicated that the lower left first molar had previously received root canal treatment 3 years ago. The patient's medical history was noncontributory. There was no history of drug allergies. Radiographic examination showed an apparent radiolucency around the distal apex and widening of the periodontal ligament at the apex of the mesial root (Fig. 1A). The quality of the root canal filling was inadequate as, radiographically, the limit of the filling was below the standard required with a possible deviation in the apical third of the mesial and distal canals. Clinical examination showed negative response to percussion and palpation tests. Periodontal examination revealed probing depths of 3 mm or less without mobility. The tooth had been restored with amalgam. Based on the history, clinical tests and radiographs, a diagnosis of a root filled tooth with persistent periapical periodontitis was established.

The patient was informed that conventional root canal retreatment and follow-up was the initial approach to reach infection control and apical healing. However, the persistence of the sinus tract and clinical symptoms would lead to apical endodontic surgery as a complementary approach to the resolution of the pathology. The patient consented to the treatment plan.

### **Nonsurgical endodontic retreatment**

After local anesthesia (2% lidocaine with 1:100.000 epinephrine), a rubber dam was placed and the tooth and surrounding field were disinfected with 30% hydrogen peroxide followed by a 2.5% sodium hypochlorite solution for 30 seconds each. The coronal restoration and root canal filling materials were removed. Close inspection under high magnification with the dental operating microscope (D. F. Vasconcellos S/A, São Paulo, Brazil) showed an untreated distolingual canal. The root canal filling material was removed with Gates-Glidden drills in the coronal two thirds and K-files in the apical third. A further root canal retreatment was performed using the crown-down technique with 2% chlorhexidine gel as an auxiliary chemical substance followed by irrigation with a sterile physiological solution, patency, and foramen enlargement for appropriate cleaning of this area (mesiobuccal, mesiolingual, and distolingual). Apical patency could not be accomplished in the distobuccal canal due to ledging. The working length was established with an apex locator (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel). The first file that bound at the working length was #25 K-file (mesiobuccal), #25 K-file (mesiolingual), #30 K-file (distobuccal) and #30 K-file (distolingual). Three additional manual K-files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were used after the first instrument that fitted the working length. Therefore, the final file used for apical preparation at the working length was #40 K-file (mesiobuccal), #40 K-file (mesiolingual), #45 K-file (distobuccal) and #45 K-file (distolingual). A solution of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used for 3 minutes to remove the smear layer. The canals were dried with sterile paper points and then

filled with gutta-percha and Endomethasone sealer (Septodont; Saint-Maur-des-Fossés, France) using a warm vertical combined with a lateral condensation technique. After endodontic retreatment the tooth was restored with composite resin (Filtek Z250; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), which was clinically adequate. Figure 1B shows a postoperative radiograph following nonsurgical retreatment. After one month, it could be observed that the sinus tract persisted and the patient reported the persistence of discomfort upon vertical percussion. The endodontic microsurgery was indicated.

### **Periradicular microsurgery and sampling procedures**

Immediately before surgery, the gingival and mucosa were washed with 0.2% chlorhexidine gluconate for disinfection, followed by a local rinse with 5% Tween 80 and 0.07% soy lecithin (to reduce the carry-over effect of chlorhexidine).

After local anesthesia with 2% lidocaine with 1:100.000 epinephrine for the left mandibular nerve block and buccal infiltration, a mucoperiosteal flap was made. Periapical pathology was noted at the apex of the distal root with cortical bone fenestration. The periapical tissues were removed with a sterile curette, and a microbial sample was obtained by rubbing sterile paper points against the root apex, which was held in place for 60 seconds inside the surgical cavity. The paper points were pooled in a sterile tube containing 1 mL of VMGA III (12) transport medium for microbial cultivation. The sterility of the operative field was checked by collecting a periosteal tissue sample from an area adjacent to the surgical site using curettes and paper points to test for bacterial contamination.

The granulation tissue was excised, and osteotomy was performed. Three millimeters of the distal root apex were resected orthogonally to their longitudinal axis (Fig. 1C), using a tungsten-carbide straight fissure drill (Maillefer Zekrya; Dentsply-Maillefer Instruments, Ballaigues, Switzerland) under constant

0.9% sodium chloride solution irrigation with the aid of a surgical operating microscope and micromirror. The root tip was then removed with sterile tweezers, rinsed in sterile saline and placed in 0.2% trypsin solution for 24 h for later Scanning Electron Microscope (SEM) analysis.

The resected root surfaces were examined at high magnification (x12). The root-end cavity was prepared with microsurgical ultrasonic tips (Pro Ultra Surgical tips, Dentsply, Oklahoma, USA) and subsequently filled with mineral trioxide aggregate (MTA) (ProRoot, Dentsply, Tulsa, Oklahoma, USA). Flap closure was obtained with 5-0 nylon sutures. Postoperative radiographs were taken. The patient received postoperative instructions. Additional antibiotics and analgesics were provided to the patient (amoxicillin 500 mg, 3 times a day for 5 days, and ibuprofen 600 mg for pain, 2 times a day as needed). The patient returned one week later for suture removal and reported slight postoperative pain. Healing of the surgery was uneventful. The patient was examined clinically and radiographically at 6 and 24 month recall visits. The tooth was asymptomatic. Periapical healing around the apical root area could be observed in the follow-up radiographies (Fig. 1D).

### **Microbiological identification**

The isolation and identification of the microorganisms were performed by the use of culture techniques for phenotypic characterization as described previously (13). In summary, inside an anaerobic chamber, the samples were vortexed for 60 seconds and diluted in Fastidious Anaerobe Broth (FAB; Lab M, Bury, UK) by 10-fold serial dilution to  $10^{-4}$ . A volume of 50  $\mu$ L of each dilution was spread onto 5% defibrinated sheep blood Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M) containing 5 mg/mL of hemin (final concentration of 5  $\mu$ g/mL) and 1 mg/mL of vitamin K1 (final concentration of 1  $\mu$ g/mL). Selective culture media were also used as follows: 5% sheep blood FAA + NAL (0.001% w/v nalidixic acid) + VAN (0.5

mg/L vancomycin) to select gram-negative anaerobic bacteria, 5% sheep blood FAA + KAN (kanamycin) + VAN to select “black-pigmented bacteria,” 5% sheep blood FAA + NEO (0.0075% w/v neomycin) for clostridia and other anaerobes, and 5% sheep blood FAA + NAL (0.001% w/v nalidixic acid) for gram-positive anaerobes and *Actinomyces* involved. The plates were incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere for up to 14 days. The same dilutions were plated in 5% sheep blood brain heart infusion agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated aerobically at 37°C. All aerobic cultures were examined after 24 to 48 hours, whereas anaerobic cultures were kept for at least 2 weeks but examined for growth every 3 days. Preliminary characterization of microbial species was based on their growth in the anaerobic chamber; in the aerobic incubator; and also in 5% CO<sub>2</sub> incubator (IG 150 CO<sub>2</sub> incubator; Jouan SA, Saint-Herblain, France), colonial pigmentation and morphology, Gram-stain, and catalase production. Biochemical tests were used for the speciation of individual isolates as follows: Rapid ID 32 A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) for strict anaerobic rods; API Staph (BioMérieux SA) for staphylococci and micrococci; Rapid ID 32 Strep (BioMérieux SA) for streptococci; Rapid ID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc, Atlanta, GA) for *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, and *Actinobacillus*; and API C Aux (BioMérieux SA) for yeasts. Miniapi software (BioMérieux SA) was used to read ID 32 tests automatically and visually read API range tests BioMérieux.

### **Scanning electron microscope (SEM) procedure**

The root fragment removed during periradicular surgery was immediately immersed in 0.2% trypsin solution for periodontal fiber dissolution over a period of 24h. The apex was fixed in Karnovsky solution (2.5 glutaraldehyde, 4.0% paraformaldehyde and 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.02-7.4) for 1 week. The specimen was then dehydrated in an ethanol series, dehydrated in a critical point device (Denton Vacuum DCP-1, USA) and gold sputter coated (Denton Vacuum Desk II, USA). The surface of the root tip was then studied under a

scanning electron microscope operated at 15 kV (Jeol JSM – 5600 LV, Japan). Magnifications were performed to analyze the root apex with gutta-percha extruded from the initial treatment (x25) (Fig. 2), external radicular surface (x100 and x400), uninstrumented apical foramen (x200) (Fig. 3A), and colonies adhering to irregularities (x1.500 and x3.300) (Fig. 3B and 3C).

## RESULTS

In the present clinical case, association of nonsurgical and surgical procedures resulted in tooth survival in a two-year follow-up.

The preoperative periapical radiograph shows the lower left first molar with an apparent radiolucency around the distal apex and a widening of the periodontal ligament at the apex of the mesial root (Fig. 1 A). A postoperative radiograph after nonsurgical retreatment and an immediate postoperative radiograph showing the resected distal root can be seen in Figures 1 B and C. After 24 months, the follow-up radiograph demonstrated apical healing.

The resected distal root apex of the failed endodontically retreated lower left first molar was observed by SEM, which revealed bacterial biofilm surrounding the apical foramen and external radicular surface. The SEM image shows both gutta-percha overfilling extruding through a zip caused during endodontic initial treatment as well as the location of the original foramen. Extruded gutta-percha observed in the root apex was not removed after endodontic retreatment (Fig. 2).

This clinical report identified the microorganisms that should be associated with the persistence of the infection. The sample from the resected root apex surface and periapical lesion contained *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra* and *Bacteroides ureolyticus*.

## DISCUSSION

Management of post-treatment apical pathology includes nonsurgical retreatment, apical surgery, or extraction and immediate implant placement. Nonsurgical retreatment of persistent apical periodontitis is the first choice for treatment, as it is less invasive (14-15). In the present clinical case, nonsurgical retreatment was indicated due to radiographic appearance of insufficient root canal therapy. Furthermore, there was radiographic evidence of a periapical lesion with the presence of defective root filling, presence of sinus tract and coronal microleakage. Resorption lacunae at the root apex surface could be observed in the SEM image, which could have been formed in response to the bacterial by-products.

Clinicians are often misled by the belief that procedural errors, such as broken instruments, perforations, overfilling, underfilling, ledges and root canal therapies with iatrogenically altered root canal morphology can be the direct cause of endodontic failure (14). However, all cases with remaining viable bacteria in the root canal system are at constant risk of periradicular inflammation persistence. Culture and microscopic studies have reported the occurrence of extraradicular infections in both treated and untreated root canals (5).

*Actinomyces* species have previously been found in association with unhealed periapical lesions (3). They have been reported to occur in persistent and secondary intraradicular infections, and they may be a cause of extraradicular infection, especially in clinical situations associated with periapical actinomycosis.

Microorganisms in biofilm structures show higher resistance to antimicrobial agents and host defense mechanism than planktonic cells (16). Apical periodontitis has been referred to as an intraradicular biofilm-induced chronic disease (17). *P. propionicum* has been isolated from 2%-8% of the root

canal treated teeth (18), although a molecular study identified *P. propionicum* in more than one-half of the samples (19). *Actinomyces* species and *P. propionicum* have been reported to be involved in extraradicular infections, as they possess the ability to survive in the apical tissues (20)

Further knowledge of the local and systemic biological consequences of residual post-treatment root infection and post-treatment apical periodontitis must be acquired (10). Recently, long-standing inflammation has been related to the risk of cardiovascular diseases. In a study where plasma C-reactive protein (CRP), a marker for systemic inflammation, was measured in 1068 male adults, half of the cases developed coronary heart disease (CHD) over the course of a 14-year study. It was found that those with very low levels of CRP, <0.5 mg/L, rarely contracted CHD; however, when CRP was higher than 1.0 mg/L, the risk of CHD was increased (21). Further studies are required to determine if long-standing apical periodontitis of endodontic origin also elevates systemic levels of CRP in humans (22).

The clinical success of an endodontic retreatment seems to be related to changes in the natural course of the root canals caused by previous root-canal treatment (9). Preparing root canals to the apical foramen in infected canals (23), using a patency file and foramen enlargement associated with a biocompatible auxiliary chemistry substance (2% chlorhexidine gel) are resources to clean the most apical portion of the main canal. This clinical case was accomplished in a single appointment. Other studies have used intracanal medication. Ricucci & Siqueira (24) reported a persistence of bacteria in the apical root canal and within dentinal tubules even after a 75-day period of intracanal calcium hydroxide placement, which could have led to failure of endodontic the treatment.

Observation of a large patient population during a 5-year period revealed a high survival rate of teeth after endodontic retreatment performed by



endodontists, regardless of the etiology, specific treatment technique, tooth group, or special patient characteristics. Of the teeth extracted after retreatment, molars proved to be the predominant group (12.2%) (15), which might be explained by an increase in the level of complexity of retreatment procedures associated with posterior teeth.

The introduction of microsurgical techniques in endodontics considerably improved the success rate of the treatment (25). In the present clinical case, association of nonsurgical and surgical procedures resulted in tooth survival in a two-year follow-up. Nonsurgical retreatment before or in conjunction with endodontic surgery has demonstrated 1%-25% higher success rates than endodontic surgery without prior nonsurgical retreatment (26).

During surgery, the apical canals, exposed isthmuses and accessory canals (27) must be carefully located with the aid of a dental operating microscope and micromirror (28) and then, irrigated ultrasonically to remove bacteria, debris and smear layer (29) prior to filling. A root tip must be resected perpendicular to the long axis of the root to reduce the number of exposed dentinal tubules (30). Three millimeters of the apical root tissues were resected to eliminate the majority of apical ramifications and lateral canals (30). The use of magnification during endodontic procedures enhance the view of the operating field, provides better control of instruments and placement of dental materials, and allows for an improved detection and management of obstructions, anatomic variations, or fractures (31). Studies that have used the operating microscope have shown high rates of success for endodontic surgeries (32) and nonsurgical retreatment (33). MTA has been recommended for root-end filling in apical surgery, regardless of the type of treated tooth (34).

Many practitioners consider the single-tooth implant as a reasonable alternative for the preservation of the natural dentition. However, if a tooth is

deemed restorable from a restorative and periodontal aspect, endodontic therapy should be the first treatment option considered, as observed in this present case. It is important to highlight that the two treatment alternatives have different aims; endodontic treatment is provided to treat or prevent apical periodontitis, whereas implants are used to replace missing teeth (35).

In conclusion, Gram-positive anaerobic bacteria and extraradicular biofilm seem to participate in the maintenance of persistent periapical pathology, and endodontic retreatment followed by periapical microsurgery proved to be a successful alternative in the resolution of persistent extraradicular infections.

## REFERENCES

1. Siqueira JF Jr. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *Endod Topics* 2005; 10: 123-47.
2. Stropko JJ. Canal morphology of maxillary molars: clinical observations of canal configurations. *J Endod* 1999; 25: 446–50.
3. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006; 39: 249–81.
4. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod* 2008; 34: 1249-54.
5. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 73–7.
6. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod* 1990; 16: 589–95.

7. Nair PN. Cholesterol as an aetiological agent in endodontic failures: a review. *Aust Endod J* 1999; 25: 19–26.
8. Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81: 93–102.
9. Gorni FG, Gagliani MM. The outcome of endodontic retreatment: a 2-yr follow-up. *J Endod* 2004; 30: 1-4.
10. Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006; 39: 343-56.
11. von Arx T, Gerber C, Hardt N. Periradicular surgery of molars: a prospective clinical study with a one-year follow-up. *Int Endod J* 2001; 34: 520-5.
12. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966; 74: 1–380.
13. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod* 2008; 34:1451-6
14. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34: 1-10.
15. Salehrabi R, Rotstein I. Epidemiologic evaluation of the outcomes of orthograde endodontic retreatment. *J Endod* 2010; 36: 790-2.
16. Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms: the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176: 2137–42.
17. Nair PN, 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: 231–52.

18. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 86 –93.
19. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 215–22.
20. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28: 304-10.
21. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973–9.
22. Marton IJ, Kiss C. Influence of surgical treatment of periapical lesions on serum and blood levels of inflammatory mediators. *Int Endod J* 1992; 25: 229–33.
23. Buchanan LS. The standardized-taper root canal preparation – Part 1. Concepts for variably tapered shaping instruments. *Int Endod J* 2000; 33: 516–29.
24. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod* 2008; 34: 1124-9.
25. Karabucak B, Setzer FC. Conventional and surgical retreatment of complex periradicular lesions with periodontal involvement. *J Endod* 2009; 35: 1310-5.
26. Wang N, Knight K, Dao T, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study—phases I and II: apical surgery. *J Endod* 2004; 30: 751–61.

27. von Arx T. Frequency and type of canal isthmuses in first molars detected by endoscopic inspection during periradicular surgery. *Int Endod J* 2005; 38: 160–8.
28. Rubinstein RA, Kim S. Short-term observation of the results of endodontic surgery with the use of a surgical operation microscope and super-EBA as root-end filling material. *J Endod* 1999; 25: 43–8.
29. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J* 2004; 37: 672–8.
30. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. *J Endod* 2006; 32: 601–23.
31. Carr GB. Microscopes in endodontics. *J Calif Dent Assoc* 1992; 20: 55–61.
32. Taschieri S, Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R. Endodontic surgery using 2 different magnification devices: preliminary results of a randomized controlled study. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64: 235–42.
33. de Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, Marquis V, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study—phases 3 and 4: orthograde retreatment. *J Endod* 2008; 34: 131–7.
34. von Arx T, Hänni S, Jensen SS. Clinical results with two different methods of root-end preparation and filling in apical surgery: mineral trioxide aggregate and adhesive resin composite. *J Endod* 2010; 36: 1122–9.
35. Morris MF, Kirkpatrick TC, Rutledge RE, Schindler WG. Comparison of nonsurgical root canal treatment and single-tooth implants. *J Endod* 2009; 35: 1325–1330.

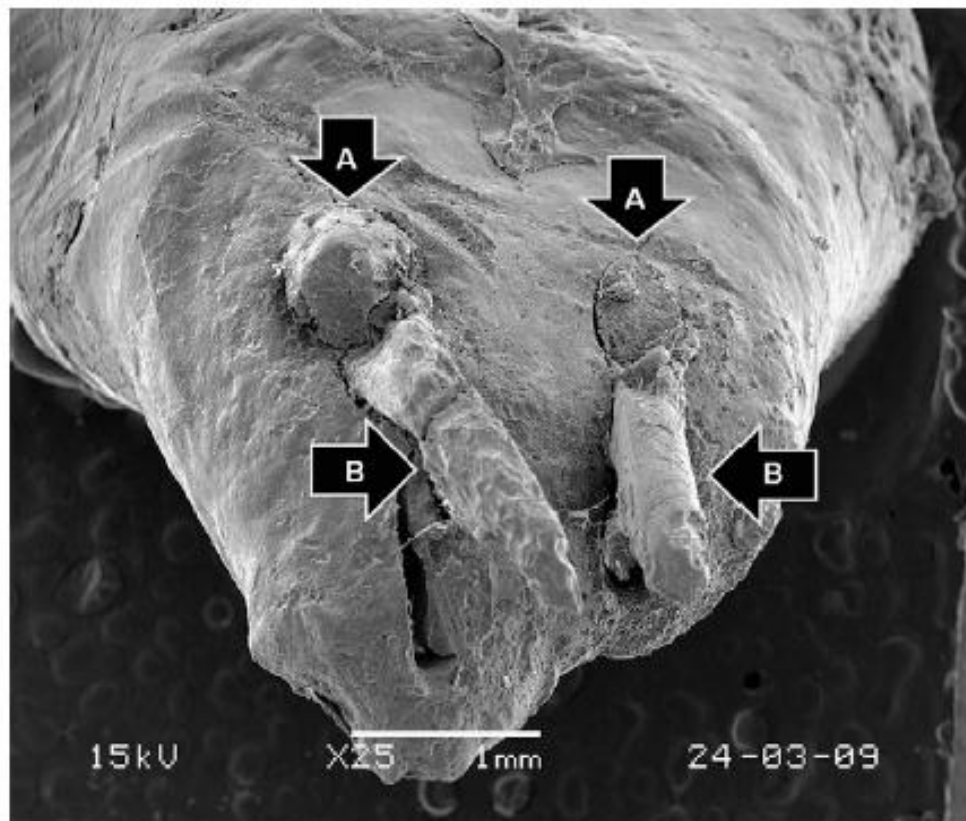




**Figure 1.** (A) A preoperative periapical radiograph showing tooth #36 with an apparent radiolucency around the distal apex and widening of the periodontal ligament at the apex of the mesial root. (B) A postoperative radiograph after nonsurgical retreatment. (C) An immediate postoperative radiograph showing the resected distal root. (D) The 24-month radiograph follow-up showing apical healing.

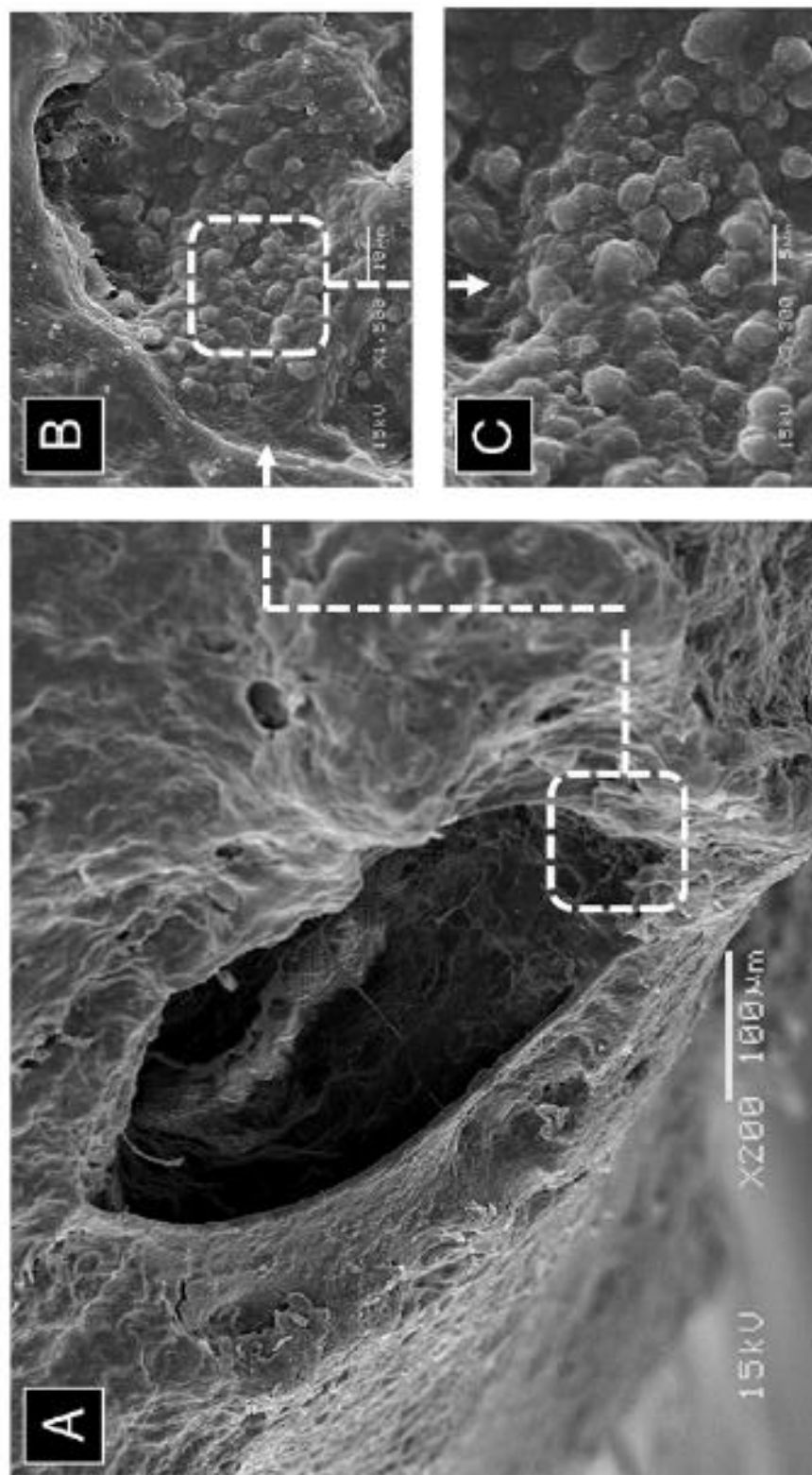






**Figure 2.** A scanning electron micrograph of extruded gutta-percha observed in the root apex was not removed after endodontic retreatment (magnification  $\times 25$ ). (A) The filling material after nonsurgical root canal retreatment. (B) Previous root canal filling material that extruded through apical ledging during deobturation.





**Figure 3.** (A) Uninstrumented apical foramen ( $\times 200$ ). (B and C) Bacterial colonies adhering to external radicular surface ( $\times 1,500$  and  $\times 3,300$ ).



## 2.2. Capítulo 2 - Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with chronic apical periodontitis

### ABSTRACT

**Introduction:** The objective of this research was to investigate the presence of viable bacteria in tissue samples from chronic periradicular lesions, correlating the microbiological findings with the histopathological diagnosis of the lesion.

**Methods:** Twenty persistent apical lesions associated with well-performed endodontic retreatment were collected. Tissue samples were processed through culture techniques including serial dilution, plating, aerobic and anaerobic incubation, and biochemical tests for microbial identification, followed by histopathological diagnosis.

**Results:** Cysts were more frequently diagnosed (13/20). Strict anaerobic species predominated in both cysts (80.4% of the species detected) and granulomas (65% of the species detected). Viable gram-positive bacteria were frequently recovered from apical lesions (cysts 70.6%, granulomas 84.4%), *Gemella morbillorum* and *Propionibacterium acnes* were the most frequently species from cyst and granuloma, respectively. At least one gram-positive bacterial species were present in almost every sample (cyst 12/13, granuloma 7/7). No significant correlation was found between histological findings and bacterial species.

**Conclusions:** In conclusion, although cysts were more frequent than granulomas in cases of failure of the endodontic retreatment, bacteria were isolated from both types of lesions, with a predominance of gram-positive species, suggesting that these species can survive outside the root canal and might be related with the persistence of the pathological process even after accurate endodontic retreatment.

**Key-words:** apical periodontitis; nonsurgical retreatment; endodontic failure; apical surgery; endodontic outcome.

## INTRODUCTION

Surgical endodontic treatment is recommended for teeth with longstanding apical lesions that persist even after accurately executed conventional endodontic retreatment (1-2). The main goal of periapical surgery is to remove the etiological agent, which is normally associated with extraradicular biofilm on longstanding periapical lesions (3-7), periapical actinomycosis (8), foreign-body reactions triggered by extruded endodontic materials (9), accumulation of endogenous cholesterol crystals in the apical tissues (10), or with unresolved cystic lesions (11).

Microorganisms which reach the environment beyond root canal foramen are recognized by the immune system, initiating a local inflammatory response through a series of events aiming to eliminate the infection, providing conditions to restore host balance (12). However, many pathogens might survive due to their ability to bypass, respond or resist to the host defense mechanisms, colonizing external root surface and leading to biofilm formation (13).

Microbial species associated with complexes bacterial communities organized on a biofilm, possess characteristics that differ from their planktonic forms, such as increased metabolic diversity and efficiency; resistance to phagocytic cells, antimicrobial agents and environmental stresses; and enhanced pathogenicity (13, 14). These turn the extraradicular biofilm a tough challenge to overcome by means of endodontic non-surgical approach.

Despite a vast discrepancy in the incidence of different types of periapical lesions, granulomas are likely the most common pathology (3, 15-22). Previous studies reported the frequency of cysts ranging from 6% to 55% (16-22), while the occurrence of periapical granulomas varies between 46% (19) and 94% (17).

In order to better understand the microbial species associated with complexes bacterial communities, the objective of this research was to identify the presence of viable bacteria in persistent apical periodontitis and to correlate the microbiological findings with the histopathological diagnosis of the lesion.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patient Selection**

Twenty patients selected for this research (between 18 and 65 years old; 6 males and 14 females) signed an informed consent (IC) according the Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School – UNICAMP and were referred to the Endodontics Specialization Clinic of the Piracicaba Dental School (FOP), State University of Campinas (UNICAMP), Sao Paulo – Brazil, in need of endodontic surgery (confirmed by the presence of persistent radiolucent area in the periapical region even after one year follow-up of endodontic retreatment). The following clinical/radiographic features were found and recorded: the presence of swelling (SW), pain on palpation (POP), tenderness to percussion (TTP), the size of the radiographic lesion (SRL)  $\geq 5$  mm and  $< 5$  mm and time after retreatment (TR) 12-24 months and  $> 24$  months.

Patients with teeth featuring sinus tracts (in order to exclude chronic apical abscess), periodontal probing depths  $> 4$  mm, root fracture or treated with antibiotics over the last three months were excluded from this study.

### **Radiographical aspects**

Teeth showing satisfactory canal filling: uniform radiodensity and adaptation of the filling to the root canal walls, root canal filling ending short of the

apex by 2mm or less, no extruded gutta-percha beyond the apex; and presence of periapical lesion related to endodontically retreated tooth were selected (**Figure 1.A**). Patients requiring retreatment owing to missing canals, separated endodontic instruments, root canal deviations, perforations or calcified root canals in which the apex was inaccessible and inadequate endodontic filling (under or over-filling) were excluded.

All sampled teeth presented appropriate permanent coronal restorations, presenting no secondary carious lesions, no marginal defects, fractures or material loss.

### **Sample Collection**

The protocol used for sample collection was based on Subramanian & Mickel (23).

One minute-long rinse with 0.2% chlorhexidine gluconate and swabbing of the surgical area with 2% chlorhexidine gel (Endogel, Itapetininga, SP, Brazil) were performed to avoid external contamination. After local anesthesia, a full-thickness mucoperiosteal flap was reflected using intrasulcular incision and the root end was accessed with a surgical bur (KG Sorensen, Sao Paulo, SP, Brazil) cooled with sterile saline. After the reflection of the flap, periosteal tissue samples were collected from areas adjacent to the surgical site using curettes and absorbent paper cones to test for bacterial contamination. The periradicular tissue removed by curettage (**Figure 1.B**) was part stored in eppendorf tube containing 1.0 ml of transport medium VMGA III - Viability Gotemborg Agar Medium (24), which was immediately transported to the laboratory for culture analysis; and part was immersed in 10% neutral buffered formalin for further histopathological examination.



## Microbial Culture

Microorganism isolation and characterization was performed as previously described by Gomes *et al.* (26). Briefly, aliquots of 50 mL were retrieved from the vortexed VMGA tubes of each sample in anaerobic environment (Anaerobic Chamber, Don Whitley Scientific, Bradford, UK) at 37°C, inoculated and incubated as follows: plates containing BHI Agar (Brain Heart Infusion Agar – Himedia, Mumbai, India) + 5% sheep blood, incubated in O<sub>2</sub> (aerobically) at 37°C for two days for detection of facultative anaerobes; plates containing pre-reduced FAA - "Fastidious anaerobe agar" (Lab M, Bury, UK) + 5% sheep blood + 600 µL of Menadione (Vitamin K<sub>3</sub>, 2-Methyl-1,4-naphthoquinone - SIGMA M5625 ) + 600 µL of hemin (Hemin Bovine Minimum 80% - SIGMA H5533), incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere with 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 80% N<sub>2</sub> up to 14 days to detect fastidious microorganisms.

Phenotypic characterization was performed under a stereomicroscope 3X (Lambda Let 2. Atto Instruments Co., Hong Kong) according to the macroscopic features and each different colony was subcultured onto both a FAA pre-reduced plate and a BHI blood agar plate to test for their gaseous requirement. Pure cultures were subjected to gram staining (Newprov - Laboratory Products, Pinhais, PR, Brazil) and tested for catalase production. Besides, the oxidase test was performed in gram-negative and catalase-positive strains.

Appropriate biochemical testing kits (BioMérieux SA, Marcy l'Étoile, France) specific for each strain according to their previously determined features was selected as follows: Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for gram-negative and gram-positive anaerobes; API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for staphylococci and micrococci (Gram-positive, catalase-positive); API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for streptococci (Gram-positive, catalase-negative); API 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for

Enterobacteriaceae (enteric Gram-negative bacilli, catalase positive, oxidase-negative); API NH (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* and *Actinobacillus* (cocci and bacilli, Gram-negative, oxidase-positive facultative anaerobes); API C AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for yeasts.

## **Tissue Processing**

Samples stored in formalin were washed in running water for 5 minutes and processed for embedding in paraffin. Five-micrometer thick sections were cut from the paraffin blocks, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined under light microscopy for diagnostic confirmation of cyst or granuloma. The following features were observed: presence and distribution of acute (polymorphonuclear leukocytes) and chronic inflammatory cells, granulomatous tissue, lining epithelium and fibrous connective tissue capsule.

## **Statistical Analysis**

The data collected for each case (clinical features and bacteria isolated) were typed into a spreadsheet and statistically analyzed by using SPSS for Windows (SPSS, Inc, Chicago, IL). The Pearson chi-square test or the one-sided Fisher's exact test, as appropriate, was chosen to test the null hypothesis that there was no relationship between bacteria species such as endodontic clinical/radiographic signs/ symptoms and the presence of a specific group of bacteria in the lesion samples;  $P < .05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

The following clinical features were observed in the cases analyzed: swelling (17/20), pain on palpation (18/20) and tenderness to percussion (20/20) (Table 1). In 20 cases investigated, only one did not present cultivable bacteria. Periosteal tissue collected from surrounding areas to the surgical site showed no microbial growth, indicating absence of external contamination during sampling procedures. Cysts were more frequently diagnosed (13/20). Strict anaerobic species predominated in both cysts (80.4% of the species detected) and granulomas (65% of the species detected). Viable gram-positive bacteria were frequently recovered from apical lesions (cysts 70.6%, granulomas 84.4%), *Gemella morbillorum* and *Propionibacterium acnes* were the most frequently species from cyst and granuloma, respectively. At least one gram-positive bacterial species were present in almost every sample (cyst 12/13, granuloma 7/7). No significant correlation was found between histological findings and bacterial species.

The maximum of 7 different species were found per sample and granulomas accounted more different species per sample than cysts. Positive associations were found between the following *A. naeslundii* and *P. propionicum* ( $P=0.01$ ), *B. ureolyticus* and *E. limosum* ( $P=.032$ ); and *B. ureolyticus* and *P. oralis* ( $P=.004$ ).

The most commonly pathogen isolated in cysts were: *G. morbillorum* (61.5%), *B. ureolyticus* and *E. limosum* (30.8%), and *A. prevotii* (23.1%); whereas in granuloma it was observed a predominance of: *P. acnes* (57.1%), *G. haemolysans*, *Micrococcus* spp. and *A. naeslundii* (42.9%) (**Table 2**).

Sulfur granules, soft and bright yellow, were observed in only one case (S15). After cultured, the following microorganisms were isolated: *A. naeslundii*, *E. limosum*, *P. micra* and *P. propionicum*.

## DISCUSSION

The present study investigated the presence of viable bacteria in chronic periapical lesions associated with failure of the endodontic retreatment, 65% were cysts and 35% were granulomas. There is no consensus in the literature regarding the incidence of different types of chronic periapical lesions (16-18, 20) which can be attributed to sampling procedures, processing and interpretation of the histological material; and clinical features associated with samples. Most of these studies analyzed specimens obtained from wide sources of routine histopathological databases (18). It must be pointed out that in the present research tissue collection was performed through curettage, not including the apical portion of the affected tooth. Therefore, it was unfeasible to know their structural relation. Based on it, the periapical lesions were categorized as granulomas or cysts without any further subclassification.

The high incidence of cysts detected here is in disagreement with previous reports (11, 17-20, 23) which might be a result of the restrictive patient selection criteria used compared to other studies. To address, patients presenting sinus tracts were excluded, as it constitutes a communication between periapical lesion and oral cavity, modifying the periapical environment and changing the local microbial profile. Additionally, all samples analyzed had previously received root canal retreatment over one year follow-up, showing a periapical radiolucent area and/or other sign that suggested failure.

Except for one case where no microbial growth was found, the prevalence of one to seven microorganisms was detected both in cysts or granulomas, supporting the polymicrobial feature of persistent periapical lesions (6, 7, 24). Gram-positive bacteria accounted for 70.6% of the isolates in cysts and 84.4% in granulomas. Both histopathological types presented quite similar microbiological profiles, with a predominance of viable gram-positive bacteria highlighting a cyst is a direct evolution of a granuloma lesion.

The majority of gram-positive strains belonged to the following species: *G. morbillorum*, *P. acnes*, *A. naeslundii*, *A. prevotii*, and *E. limosum*. Gomes *et al.* (26) showed that *G. morbillorum* might be an important pathogen in endodontic infections, because of its higher percentage of recovery in both primary and secondary/persistent infections in 82% and 72% of the samples, respectively. Sunde *et al.* (27) investigated the periapical microbiota of teeth with refractory apical periodontitis, demonstrating a wide variety of microorganisms, particularly gram-positive species. Besides, it has been reported that structural components of the robust bacterial cell wall of gram-positives protect them from noxious environmental factors. In addition, the majority of these microorganisms express fast-adaptive properties when exposed to extreme conditions, thus making them potential causal elements in post-treatment endodontic disease (28). Other previous reports have also associated gram-positive species with persistent infections by investigating periapical lesions (2, 6, 29).

However, the literature is inconclusive whether these extraradicular infections are self-sufficient or they are dependent on intraradicular infections. Ricucci & Siqueira (4) investigated the prevalence of intra and extraradicular biofilm in both treated and untreated teeth, indicating their high frequency located into canal complexities, out of reach by instruments and antimicrobial irrigants and assuming that intraradicular biofilms may be responsible for the persistence of the extraradicular infection. In the present study, all tooth selected had been submitted

to thoroughly nonsurgical retreatment with the aid of surgical microscope, avoiding and overpassing operatory complications and providing accurate root canal disinfection, at least one year previously to surgical approach. Adhered biofilm was not investigated, so extreme care was taken to avoid collecting material from the external surface of the root apex during sampling procedures. Therefore, our results suggest that a viable polymicrobial community, with adequate number of cultivable cells and interacting species, was present inside the lesion.

Clinically such situation is relevant, playing a role not only in the persistence of infection, but also in disease exacerbation (30). Furthermore, the probability of a systemic disorder occurring from oral foci of infection has been suggested to be particularly prevalent in susceptible individuals with a lowered immune response, such as immunocompromised, elderly or patients with damaged heart valves (31, 32).

In recent years, molecular biological methods such as random cloning and 16S rRNA sequence analysis have been introduced in order to profile the microbiota (3, 33, 34). However, live and dead bacterial cells in the microbiota could not be differentiated by utilizing only the molecular biological methods. The present study, by using culture techniques, showed the presence of viable bacteria in cysts or granulomas in cases associated with failure of the retreatment, suggesting that these species could be related to the maintenance of the disease. However, the pathogenicity of live bacterial cells in the endodontic lesions remains to be fully determined (35).

In conclusion, although cysts were more frequent than granulomas in cases of failure of the endodontic retreatment, bacteria were isolated from both types of lesions, with a predominance of gram-positive species, suggesting that these species can survive outside the root canal and might be related with the

persistence of the pathological process even after accurate endodontic retreatment.

## REFERENCES

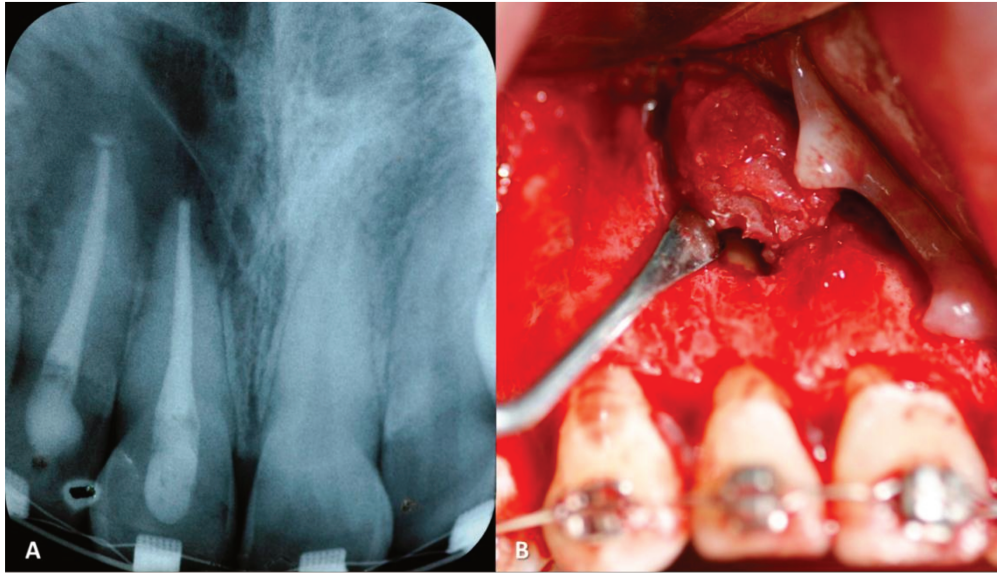
1. Gutmann JL. Principles of endodontic surgery for the general practitioner. *Dent Clin North Am* 1984; 28(4): 895-908.
2. Gutmann JL, Harrison JW. Posterior endodontic surgery: anatomical considerations and clinical techniques. *Int Endod J* 1985; 18(1): 8-34.
3. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod* 2011; 37(12): 1696-1700.
4. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010; 36(8): 1277-88.
5. Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012; 38(7): 954-9.
6. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(6): 502-5.
7. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002; 28(10): 679-83.
8. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod* 2008; 34(9): 1124-9.

9. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod* 1990; 16(12): 589-95.
10. Nair PN. Cholesterol as an aetiological agent in endodontic failures--a review. *Aust Endod J* 1999; 25(1): 19-26.
11. Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81(1): 93-102.
12. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002; 3(11): 1033-40.
13. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
14. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32 Suppl 6: 7-15.
15. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *J Endod* 1980; 6(11): 845-8.
16. Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. *J Endod* 2009; 35(5): 634-42.
17. Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42(5): 656-78.
18. Bhaskar SN. Oral surgery--oral pathology conference No. 17, Walter Reed Army Medical Center. Periapical lesions--types, incidence, and clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 21(5): 657-71.
19. Priebe WA, Lazansky JP, Wuehrmann AH. The value of the roentgenographic film in the differential diagnosis of periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1954; 7(9): 979-83.



20. Linenberg WB, Waldron CA, Delaune GF, Jr. A Clinical, Roentgenographic, and Histopathologic Evaluation of Periapical Lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1964; 17: 467-72.
21. Patterson SS, Shafer WG, Healey HJ. Periapical Lesions Associated with Endodontically Treated Teeth. *J Am Dent Assoc* 1964; 68: 191-4.
22. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71(5): 603-11.
23. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009; 35(7): 950-7.
24. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966; 74(5): Suppl: 1-380.
25. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(6): 348-81.
26. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, *et al.* *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105(4): 519-25.
27. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28(4): 304-10.
28. Chavez de Paz L. Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9: 79-96.
29. Ferreira FB, Ferreira AL, Gomes BP, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *Int Endod J* 2004; 37(1): 61-9.
30. Van Devanter, Van Dalfsen JM. How much do *Pseudomonas* biofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 504-6.

31. Debelian GJ, Eribe ER, Olsen I, Tronstad L. Ribotyping of bacteria from root canal and blood of patients receiving endodontic therapy. *Anaerobe* 1997; 3(4): 237-43.
32. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Anaerobic bacteremia and fungemia in patients undergoing endodontic therapy: an overview. *Ann Periodontol* 1998; 3(1): 281-7.
33. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 275-81.
34. Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, *et al.* Microflora profiling of infected root canal before and after treatment using culture-independent methods. *J Microbiol* 2012; 50(1): 58-62.
35. Sato T, Yamaki K, Ishida N, Hashimoto K, Takeuchi Y, Shoji M, *et al.* Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals. *Int J Dent* 2012; doi:10.1155/2012/609689;2012:609689–5.



**Figure 1.** A) Radiographic image of a failed endodontic retreatment with adequate root canal filling; B) Periradicular tissue curettage.



Table 1. Clinical and radiographic features, bacterial detection and histopathological diagnosis found in 20 apical lesions associated with persistent apical periodontitis

| Samples | Tooth | Gender | SW | POP | TTP | SRL    |        |          | TR      |         |        | N   | Gram -ve |        |     | Gram +ve |           |      | Histopathological |  |
|---------|-------|--------|----|-----|-----|--------|--------|----------|---------|---------|--------|-----|----------|--------|-----|----------|-----------|------|-------------------|--|
|         |       |        |    |     |     | < 5 mm | ≥ 5 mm | 12-24 mo | > 24 mo | species | strict | fac | total    | strict | fac | total    | Granuloma | Cyst |                   |  |
| S1      | 23    | Female |    |     | +   |        | +      | +        |         | 7       | 0      | 0   | 0        | 6      | 1   | 7        | Yes       | No   |                   |  |
| S2      | 13    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 5       | 2      | 0   | 2        | 2      | 1   | 3        | Yes       | No   |                   |  |
| S3      | 23    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 3       | 1      | 1   | 2        | 1      | 0   | 1        | Yes       | No   |                   |  |
| S4      | 13    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 2       | 0      | 0   | 0        | 2      | 0   | 2        | No        | Yes  |                   |  |
| S5      | 16    | Male   | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 6       | 2      | 0   | 2        | 3      | 1   | 4        | No        | Yes  |                   |  |
| S6      | 21    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 0       | 0      | 0   | 0        | 0      | 0   | 0        | No        | Yes  |                   |  |
| S7      | 11    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 5       | 0      | 0   | 0        | 5      | 0   | 5        | No        | Yes  |                   |  |
| S8      | 42    | Male   |    |     | +   |        | +      | +        |         | 4       | 0      | 0   | 0        | 3      | 1   | 4        | Yes       | No   |                   |  |
| S9      | 26    | Male   | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 1       | 0      | 0   | 0        | 1      | 0   | 1        | No        | Yes  |                   |  |
| S10     | 24    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 5       | 1      | 0   | 1        | 4      | 0   | 4        | No        | Yes  |                   |  |
| S11     | 16    | Male   | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 3       | 0      | 0   | 0        | 2      | 1   | 3        | No        | Yes  |                   |  |
| S12     | 22    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 5       | 4      | 1   | 5        | 0      | 0   | 0        | No        | Yes  |                   |  |
| S13     | 12    | Male   | +  | +   | +   |        | +      | +        | +       | 4       | 0      | 0   | 0        | 2      | 2   | 4        | No        | Yes  |                   |  |
| S14     | 15    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 6       | 3      | 0   | 3        | 2      | 1   | 3        | No        | Yes  |                   |  |
| S15     | 22    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 4       | 0      | 0   | 0        | 2      | 2   | 4        | Yes       | No   |                   |  |
| S16     | 36    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 4       | 0      | 0   | 0        | 3      | 1   | 4        | Yes       | No   |                   |  |
| S17     | 14    | Female |    | +   | +   |        | +      | +        |         | 4       | 1      | 0   | 1        | 2      | 1   | 3        | No        | Yes  |                   |  |
| S18     | 16    | Male   | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 5       | 2      | 0   | 2        | 2      | 1   | 3        | No        | Yes  |                   |  |
| S19     | 24    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        |         | 5       | 0      | 1   | 1        | 3      | 1   | 4        | No        | Yes  |                   |  |
| S20     | 11    | Female | +  | +   | +   |        | +      | +        | +       | 5       | 0      | 1   | 1        | 1      | 3   | 4        | Yes       | No   |                   |  |
| Total   |       |        | 17 | 18  | 20  | 9      | 11     | 18       | 2       | 83      | 16     | 4   | 20       | 46     | 17  | 63       | 7         | 13   |                   |  |

Gram-ve species, gram-negative species; Gram +ve species, gram-positive species.

**Table 2.** Frequency of bacteria found in periapical lesions, divided according to the histopathological diagnosis

| <b>Microorganism</b>                 | <b>CYST<br/>(n=13)</b> | <b>GRANULOMA<br/>(n=7)</b> |
|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>Gram positive cocci</b>           |                        |                            |
| <i>Gemella morbillorum</i>           | 8 (61.5%)              | 1 (14.3%)                  |
| <i>Gemella haemolysans</i>           | 1 (7.7%)               | 3 (42.9%)                  |
| <i>Gemella spp.</i>                  | 0                      | 1 (14.3%)                  |
| <i>Micrococcus spp.</i>              | 0                      | 3 (42.9%)                  |
| <i>Parvimonas micra</i>              | 2 (15.4%)              | 2 (28.6%)                  |
| <i>Anaerococcus prevotii</i>         | 3 (23.1%)              | 2 (28.6%)                  |
| <i>Staphylococcus xylosus</i>        | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Streptococcus constellatus</i>    | 0                      | 1 (14.3%)                  |
| <b>Gram positive bacilli</b>         |                        |                            |
| <i>Actinomyces naeslundii</i>        | 2 (15.4%)              | 3 (42.9%)                  |
| <i>Actinomyces meyeri</i>            | 1 (7.7%)               | 1 (14.3%)                  |
| <i>Eubacterium limosum</i>           | 4 (30.8%)              | 1 (14.3%)                  |
| <i>Eggerthella lenta</i>             | 2 (15.4%)              | 0                          |
| <i>Clostridium difficile</i>         | 2 (15.4%)              | 2 (28.6%)                  |
| <i>Clostridium spp.</i>              | 2 (15.4%)              | 0                          |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i>    | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Clostridium bifermentans</i>      | 1 (7.7%)               | 1 (14.3%)                  |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i>     | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Clostridium botulinum</i>         | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Propionibacterium acnes</i>       | 2 (15.4%)              | 4 (57.1%)                  |
| <i>Propionibacterium propionicum</i> | 2 (15.4%)              | 2 (28.6%)                  |
| <b>Gram negative cocci</b>           |                        |                            |
| <i>Neisseria meningitidis</i>        | 0                      | 2 (28.6%)                  |
| <i>Neisseria cinerea</i>             | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Veillonella spp.</i>              | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Stenotrophomonas matophilia</i>   | 0                      | 1 (14.3%)                  |
| <i>Capnocytophaga spp.</i>           | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <b>Gram negative bacilli</b>         |                        |                            |
| <i>Bacteroides fragilis</i>          | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Bacteroides ureolyticus</i>       | 4 (30.8%)              | 0                          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | 0                      | 1 (14.3%)                  |
| <i>Pseudomonas luteola</i>           | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Porphyromonas endodontalis</i>    | 1 (7.7%)               | 0                          |
| <i>Prevotella oralis</i>             | 3 (23.1%)              | 0                          |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i>       | 1 (7.7%)               | 1 (14.3%)                  |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i>    | 1 (7.7%)               | 0                          |

### **3. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

#### **3.1. Justificativa da pesquisa**

O conhecimento do perfil microbiano do insucesso do retratamento endodôntico é importante para o melhor entendimento da persistência da infecção em casos de periodontite apical crônica e para a seleção da terapia endodôntica adequada a ser instituída para tal diagnóstico.

Embora existam métodos de diagnóstico microbiológico que empregam apenas o estudo de sequências de ácidos nucleicos para a caracterização de comunidades microbianas em infecções endodônticas persistentes, o método de cultura microbiana permite a obtenção de cepas microbianas viáveis, permitindo posteriormente a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana e caracterização de fatores de virulência de cepas isoladas. Estas pesquisas poderão ser feitas em colaboração com instituições internacionais com as quais a pesquisadora mantém contato.

Desta forma, para melhor entendimento das características da infecção presente na periodontite apical persistente, o presente estudo utilizou tecido diretamente coletado de 20 lesões periapicais, correlacionando os dados microbiológicos com os achados clínicos e histopatológicos. Avaliou também a viabilidade clínica da cirurgia parendodôntica na resolução de um caso de periodontite apical persistente, quando precisamente recomendada.

#### **3.2. Infecção endodôntica persistente**

A comunidade microbiana presente na infecção primária é mista, composta predominantemente por bactérias anaeróbias estritas gram-negativas (Hancock *et al.*, 2001; Montagner 2009). Nos casos de dentes já tratados

endodonticamente há um predomínio de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas (Sundqvist *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004). Existem casos onde o retratamento é executado de maneira meticulosa, seguindo as mais restritas recomendações de técnicas e princípios, pressupondo a eliminação da infecção intrarradicular e ainda assim, resultando em uma periodontite apical persistente (Nair *et al.*, 1999) possivelmente associada a infecção extrarradicular.

Considerando os estudos que identificam a microbiota presente na infecção extrarradicular persistente encontramos frequentemente microrganismos gram-positivos (Tabela 1), com capacidade de se organizar em biofilmes, porém muitas vezes os casos selecionados para tais estudos não ficaram restritos àqueles onde o insucesso resultava de uma infecção persistente (Noiri *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2009; Ricucci & Siqueira, 2010), uma vez que critérios com relação a qualidade da obturação, restauração coronária ou presença de fístula não foram levados em consideração.

Tabela 1. Estudos identificando a microbiota presente em infecção extrarradicular

| <b>Estudos<br/>(Método)</b>                         | <b>n</b> | <b>Coleta</b>                                     | <b>Perfil Microbiano</b>                                                                   |
|-----------------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Molander <i>et al.</i> , 1998<br>(Cultura)          | 120      | Canal radicular<br>Qualidade T.E.                 | 69% Gram-positivos facultativos                                                            |
| Hancock <i>et al.</i> , 2001<br>(Cultura)           | 54       | Canal radicular<br>Rest. Provisória/Ruim/Boa      | 80.4% Gram-positivos                                                                       |
| Sunde <i>et al.</i> , 2002<br>(Cultura)             | 36       | Lesão periapical<br>Presença de fístula/exsudação | 51% Anaeróbios estritos<br>79.5% Gram-positivos                                            |
| Pinheiro <i>et al.</i> , 2003<br>(Cultura)          | 60       | Canal radicular<br>Qualidade T.E.                 | 57.4% An. Facultativos<br>83.3% Gram-positivos                                             |
| Fujii <i>et al.</i> , 2009<br>(Cultura e Molecular) | 20       | Ápice radicular<br>P.A.P. com/sem fístula         | 51.6% An. Facultativos<br>Equilíbrio Gram +/-                                              |
| Subramanian & Mickel,<br>2009 (Molecular)           | 34       | Ápice/Lesão periapical<br>Sem fístula ou bolsa    | Perfil microbiano do ápice<br>radicular/lesão diferentes                                   |
| Wang <i>et al.</i> , 2012<br>(Molecular)            | 13       | Ápice radicular<br>Qualidade T.E.                 | 84.6% <i>Actinomyces</i> sp.<br>61.5% <i>Propionibacterium</i><br>Biofilme extra-radicular |



O insucesso do retratamento endodôntico está usualmente ligado a terapia endodôntica deficiente, com falhas durante a execução da limpeza e modelagem dos canais radiculares ou mesmo durante a obturação de todo o sistema e restauração coronária. Em tais casos o perfil microbiano esperado seria próximo ao da infecção primária, uma vez que a mesma não foi satisfatoriamente eliminada pela terapia instituída. Os fatores acima citados serviram, portanto, como critérios de exclusão neste estudo.

A taxa de sucesso do retratamento de um dente com periodontite apical, executado por um especialista, gira em torno de 85%, enquanto que em um dente tratado primariamente, em 94% (Imura *et al.*, 2007). Destes 15% de insucesso constatado no retratamento, uma porcentagem significativa ainda deve seu fracasso a iatrogenias oriundas do primeiro tratamento, reservando uma porcentagem ainda mais baixa para aqueles casos onde o insucesso do retratamento realmente sugere uma infecção persistente extrarradicular. Este foi o perfil buscado neste trabalho, representando inclusive um desafio pelo número restrito destes casos na clínica diária.

Buscando elucidar a presença da infecção extrarradicular, Grossman (1959) pesquisou microbiologicamente lesões periapicais com diferentes diâmetros radiográficos. A obturação de alguns canais radiculares só foi realizada após obtenção, de no mínimo, duas culturas bacteriológicas negativas, sendo então realizada apicectomia e remoção da lesão. De 109 casos, 93 (85,3%) confirmaram ausência de microrganismos nos tecidos periapicais. Por outro lado, Iwu *et al.* (1990) avaliaram 16 casos e verificaram crescimento bacteriano em 14 (88,0%). Nesse estudo foram isoladas 47 espécies bacterianas, com média de 1 a 6 por lesão, sendo 55,0% anaeróbias facultativas e 45,0% anaeróbias estritas.

Estudos têm demonstrado que bactérias podem ser isoladas de lesões apicais, fora do sistema de canais radiculares (Gatti *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2004,

Fujii *et al.*, 2009). Sunde *et al.* (2002), utilizando métodos de cultura, encontraram uma predominância de bactérias gram-positivas anaeróbias estritas e facultativas em 36 casos de periodontite apical refratária. Além disso, grânulos sulfurosos estavam presentes em 25% dos casos, onde foram identificadas quatro espécies de *Actinomyces*: *A. israelii*, *A. viscosus*, *A. meyeri* e *A. naeslundii* e um amplo espectro de outras bactérias presentes não apenas nos grânulos, mas também nas lesões periapicais. A alta incidência observada sugere seu papel significativo na manutenção da infecção. A ocorrência destes grânulos foi observada apenas em um caso coletado (Caso 15) no presente trabalho, associada a presença das seguintes espécies: *A. naeslundii*, *E. limosum*, *P. micra* e *P. propionicum*.

Para determinar associações entre espécies, Sundqvist *et al.* (1992); Gomes *et al.* (1994) e Peters *et al.* (2002) utilizaram teste de odds ratio verificando a presença de uma determinada espécie, na presença ou ausência de demais espécies bacterianas identificadas. O mesmo foi realizado no presente estudo, considerando associação positiva entre uma determinada espécie na presença de outra espécie, quando o odds ratio foi maior do que 2; enquanto duas espécies foram consideradas negativamente associadas, quando o odds ratio em detectar uma espécie na presença de outra fosse menor 0,5.

Foram encontradas associações positivas entre *A. naeslundii* e *P. propionicum*, *B. ureolyticus* e *E. limosum*; e *B. ureolyticus* e *P. oralis*. Espécies de *Actinomyces* e *Propionibacterium propionicum* tem sido associados a infecções extrarradiculares, inclusive em conjunto, como uma patologia apical denominada actinomicose (Happonen, 1986; Sjogren *et al.*, 1988; Noiri *et al.*, 2002; Siqueira, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Ricucci & Siqueira, 2008; Wang *et al.*, 2012). *Actinomyces* spp. são considerados colonizadores primários da cavidade oral e desempenham um papel crucial no início do desenvolvimento da placa (Yeung, 1999). Além disso, foram relatados nos casos de infecções persistentes nos canais radiculares (Kalfas *et al.*, 2001). Sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis como o extrarradicular pode ser resultado da presença de enzimas

extracelulares, como aquelas envolvidas no metabolismo da sucrose ou uréia, provendo sua demanda nutricional (Yeung, 1999).

### **3.3. Diagnóstico histopatológico**

Neste estudo observou-se uma alta incidência de cistos (65%) relacionados aos casos de periodontite apical persistente, diferente do encontrado em trabalhos anteriores, onde o granuloma foi a patologia mais comumente relatada (Priebe *et al.*, 1954; Bhaskar, 1966; Block *et al.*, 1976; Simon, 1980; Lin *et al.*, 1991, Schulz *et al.*, 2009).

Tal discrepância é justificada principalmente pelos diferentes critérios na seleção dos casos e pelas mais variadas classificações adotadas pelos estudos (Simon *et al.*, 1980; Nair *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 2009). No presente trabalho foram selecionados apenas aqueles casos onde o retratamento endodôntico havia sido realizado de forma satisfatória há pelo menos um ano prévio a coleta, os dentes estavam restaurados de forma adequada, não havia qualquer comunicação da lesão com a cavidade oral através de fístulas e não havia evidência de doença periodontal e/ou perda óssea. Além disso, a classificação histopatológica das patologias crônicas avaliadas ficou restrita apenas a distinção entre granuloma e cisto, como ocorreria durante a biópsia da rotina clínica.

Independente do diagnóstico histopatológico, bactérias viáveis foram encontradas tanto em cistos, quanto em granulomas, com um predomínio de espécies gram-positivas em ambas. Porém não houve correlação entre diagnóstico histopatológico e espécies bacterianas ou sinais e sintomas clínicos.

### 3.4. Cirurgia parendodôntica

O êxito da terapia endodôntica pode ser descrito como a manutenção do dente na cavidade bucal em função, sem prejuízos a saúde do paciente. O tratamento endodôntico deve seguir princípios científicos e biológicos para que sejam reduzidas as possibilidades de falhas e acidentes. Isso pode variar de acordo com a seleção correta dos casos, sendo que observado o estado geral de saúde do paciente; as condições do elemento dentário, com especial atenção a interpretação radiográfica; a técnica empregada e habilidade do operador, o que pode acarretar inadequação do acesso, perfurações, fratura de instrumentos, sobre-obturações e obturações incompletas, dentre outros.

A cirurgia apical é uma opção de tratamento endodôntico para a resolução de periodontite apical persistente, quando o tratamento ortógrado (não-cirúrgico) não obteve sucesso. A frequência da periodontite apical persistente foi demonstrada em até 65% dos dentes tratados em diferentes populações (Eriksen *et al.*, 2002). A abordagem preferencial nesses casos é o retratamento endodôntico; entretanto, uma análise específica de riscos-benefícios, não deixando de considerar a vontade do paciente, pode indicar para a cirurgia (Friedman, 2002). Como alternativa ao retratamento endodôntico, ortógrado ou retrógrado, seria a exodontia do elemento dental e reabilitação com implantes ou outras modalidades de prótese fixa ou removíveis (Bigras *et al.*, 2008).

Dessa forma, dentes com periodontite apical persistente pós-tratamento tem a disposição três opções de tratamento. Uma consideração importante no momento dessa decisão sobre qual optar é determinar a origem do insucesso e assim o prognóstico do caso, de acordo com as melhores evidências atuais para cada modalidade de tratamento (von Arx *et al.*, 2012).

### **3.5. Material e Métodos utilizados**

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, conforme certificado no Anexo 1.

Foram avaliadas neste estudo vinte lesões periapicais coletadas cirurgicamente de casos de insucesso do retratamento endodôntico, depois de transcorridos pelo menos 12 meses do retratamento não-cirúrgico; e um caso relatado separadamente, coletado de um primeiro molar inferior esquerdo que apresentava persistência de sinais e sintomas mesmo após um mês de retratamento endodôntico.

A desinfecção do campo operatório e o acesso cirúrgico foram realizados de acordo com Subramanian & Mickel (2009), de forma a garantir a ausência de contaminação da saliva.

O instrumental com o qual foi pinçada a lesão após a liberação de suas bordas da cavidade patológica não havia sido utilizado até o referido momento, para evitar seu contato com qualquer fluido eventualmente contaminado durante o transoperatório.

A seleção dos pacientes segundo critérios de inclusão/exclusão, a técnica passo a passo da coleta microbiológica e detalhamento dos materiais e métodos, processamento laboratorial estão descritos detalhadamente no Apêndice 1. Devido a dificuldade imposta pelos critérios de seleção rigorosos, os vinte casos foram coletados ao longo de quatro anos.

O meio de transporte VMGAIII (Viability Medium Göteborg Agar) foi descrito inicialmente por Möller (1966) e por Dahlén *et al.* (1993) e é preparado para suportar microrganismos anaeróbios estritos e facultativos sem favorecer

crescimento microbiano. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluida acima de 30°C (Apêndice 2).

O processamento e diagnóstico histopatológico foram realizados no Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, seguindo seu protocolo padrão.

## 4. CONCLUSÃO

1. Bactérias anaeróbicas gram-positivas e biofilme extrarradicular parecem participar da manutenção de uma patologia periapical persistente, e o retratamento endodôntico seguido de microcirurgia provaram ser uma alternativa eficaz na resolução das infecções extrarradiculares persistentes **(Capítulo 1)**.
2. Embora os cistos tenham sido mais frequentes que granulomas nos casos de insucesso do retratamento endodôntico, bactérias foram isoladas em ambos os tipos de lesão, com uma predominância de espécies gram-positivas, sugerindo que as mesmas são capazes de sobreviver fora do canal radicular e podem estar relacionadas com a persistência do processo patológico, mesmo após um retratamento endodôntico acurado **(Capítulo 2)**.





## REFERÊNCIAS

1. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31(1): 39-47.
2. Bhaskar SN. Oral surgery--oral pathology conference No. 17, Walter Reed Army Medical Center. Periapical lesions--types, incidence, and clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 21(5): 657-71.
3. Bigras BR, Johnson BR, BeGole EA, Wenckus CS. Differences in clinical decision making: a comparison between specialists and general dentists. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106(1): 139–44.
4. Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42(5): 656-78.
5. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89(4): 321-8.
6. Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. *J Endod* 2009; 35(9): 1303–9.
7. Chan S, Mohammed N, Dobeck JM, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Evaluation of the whole genome DNA-DNA hybridization technique to identify bacteria in histological sections of periradicular lesions. *J Endod* 2004; 30(7): 518-22.

8. Chavez de Paz L. Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004; 9: 79-96.
9. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(6): 375-82.
10. Eriksen HM, Kirkevang L-L, Petersson K. Endodontic epidemiology and treatment outcome: general considerations. *Endod Topics* 2002; 2: 1–9.
11. Ferreira FB, Ferreira AL, Gomes BP, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *Int Endod J* 2004; 37(1): 61–9.
12. Friedman S. Considerations and concepts of case selection in the management of post-treatment endodontic disease (treatment failure). *Endod Topics* 2002; 1: 54–78.
13. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(6): 502-5.
14. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(5): 197-204.
15. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994a; 27(6): 291-8.

16. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios* 1994b; 80(325): 231-43.
17. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(2): 71-6.
18. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996; 29(2): 69-75.
19. Grossman LI. Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of infected pulpless teeth. *J Dent Res* 1959; 38(1): 101-4.
20. Hancock HH III, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(5): 579–86.
21. Happonen RP. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. *Endod Dent Traumatol* 1986; 2(5): 205-9.
22. Imura N, Pinheiro ET, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endod* 2007; 33(11): 1278-82.
23. Iwu C, Macfarlane TW, Mackenzie D, Stenhouse D. The microbiology of periapical granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69(4): 502-5.

24. Kalfas S, Figdor D, Sundqvist G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radicidentis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92(2): 208-14.
25. Kronfeld R. Histopathology of the teeth and their surrounding structures. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1939. p. 209.
26. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71(5): 603-11.
27. Lomçali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. Endod Dent Traumatol 1996; 12(2): 70-6.
28. Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulski-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. J Endod 1987; 13(12): 559-65.
29. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998; 31(1): 1–7.
30. Möller A.J.R. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies. Odontol Tidskr. 1966; 74(5):Suppl:1-380.
31. Montagner, F. Identificação microbiológica em dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e a suscetibilidade antimicrobiana de algumas bactérias anaeróbias isoladas [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.

32. Moreillon P, Majcherczyk PA. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(9): 632–41.
33. Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87(5): 617-27.
34. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81(1):93-102.
35. Nair PNR. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000* 1997; 13, 121–48.
36. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13(1): 29–39.
37. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002; 28(10): 679-83.
38. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 2002; 35(8): 698–702.
39. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36(1): 1–11.

40. Priebe WA, Lazansky JP, Wuehrmann AH. The value of the roentgenographic film in the differential diagnosis of periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1954; 7(9): 979-83.
41. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 2009; 35(4): 493–502.
42. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod* 2008; 34(9): 1124–9.
43. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010a; 36(8): 1277-88.
44. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod* 2010b; 36(1): 1–15.
45. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. *J Endod* 2004; 30(12): 846-50.
46. Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. *J Endod* 2009; 35(5): 634-42.
47. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *J Endod* 1980; 6(11): 845-8.

48. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SSM, Alves FRF, Rosado AF. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod* 2008; 34(12): 1457-61.
49. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-Direct polymerase chain reaction. *J Endod* 2001; 27(3): 164-67.
50. Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94(3): 281-93.
51. Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003; 36(7): 453-63.
52. Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16(10): 498-504.
53. Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21(4): 277-82.
54. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009; 35(7): 950-7.
55. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28(4): 304-10.

56. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(1): 86–93.
57. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992; 18(9): 427-430.
58. Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 2001; 9(5): 222–27.
59. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6(2): 73–7.
60. van Deventer DR, van Dalfsen JM. How much do *Pseudomonas* biofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 2005; 39(6): 504–6.
61. von Arx T, Jensen SS, Hanni S, Friedman S. Five-Year Longitudinal Assessment of the Prognosis of Apical Microsurgery. *J Endod* 2012; 38(5): 570–79.
62. Walton RE, Ardjimand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod* 1992; 18(5): 216-27.
63. Wang JJ, Y.; Chen, W.; Zhu, C.; Liang, J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012; 38(7): 954-9.



64. Yeung MK. Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. Crit Ver Oral Biol Med 1999; 10(2): 120-38.



## **APÊNDICE 1 - Material e métodos e ilustrações dos experimentos**

Os procedimentos envolvidos nesta tese estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, conforme certificado (Anexo 1).

### **Micro-cirurgia periapical e procedimentos de coleta**

O método utilizado neste estudo já foi descrito por Subramanian & Mickel (2009).

A desinfecção intraoral do campo operatório foi realizada através de bochecho com solução aquosa de digluconato de clorexidina 0,12% por um minuto e de esfregaço da região com gaze estéril umedecida em clorexidina 2% gel (Figura 1A), seguida de neutralização do efeito residual da clorexidina com solução de 5% Tween 80 e 0,07% de lecitina de soja. Após anestesia troncular e complementação com infiltração local, ambos com lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000, foi refletido um retalho total muco-periosteal composto por uma incisão intrassulcular e uma ou duas verticais, de acordo com a necessidade de acesso (Figuras 1B-D). Amostras de tecido periosteal foram coletadas de áreas adjacentes ao sítio cirúrgico usando curetas e cones de papel absorvente estéril para testar se houve contaminação bacteriana do local.

A região apical do dente envolvido foi acessada com uma broca esférica em alta rotação refrigerada com solução salina estéril. O tecido periapical foi removido por curetagem e colocado sobre gaze estéril, foi seccionado em duas partes com auxílio de uma lâmina de bisturi 15C estéril (Swann Morton, Sheffield, Inglaterra) (Figuras 1E e 1F). Parte dele foi armazenada em eppendorf contendo

1,0 ml de meio de transporte VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993) até o momento do processamento, que ocorreu imediatamente após o término do procedimento clínico, nunca ultrapassando um período de 4 horas, garantindo a viabilidade celular necessária para a recuperação dos microrganismos através da técnica de cultura microbiana (Figura 1G). Outra parte do tecido foi armazenada em formol 10% e enviada para diagnóstico histopatológico (Figura 1H) no Serviço de Histopatologia da Área de Patologia da FOP-UNICAMP. Três milímetros do ápice radicular foram removidos através de apicectomia realizada com broca Zekrya (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça) num ângulo o mais próximo possível de 90° em relação ao longo eixo do dente. Quando possível esse fragmento apical foi armazenado em tubo plástico do tipo eppendorf podendo ser utilizado para futuras pesquisas.

Dependendo da avaliação com o uso de micro-espelho sob magnificação com microscópio operatório da condição do tratamento endodôntico presente e selamento da guta-percha, foi decidido pela execução ou não do preparo retrógrado. Quando necessário, pontas de ultrassom foram utilizadas em aparelho ProfiClass (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para o preparo da cavidade. As retropontas utilizadas foram T0F-1 e T0F-2 (CVDVale, São José dos Campos, SP, Brasil) com o adaptador UA-3 (CVDVale, São José dos Campos, SP, Brasil). O operador aplicou movimentos suaves de introdução e retirada na retrocavidade até atingir a profundidade de três milímetros. Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador auxiliado por um microscópio operatório (DM 2003, Opto Corp, North Miami, FL, EUA). Para obturação desta cavidade foi utilizado MTA (Angelus, Londrina, PR, Brasil) manipulado de acordo com as recomendações do fabricante. O retalho foi reposicionado e suturado com fio de nylon 5-0 não reabsorvível através de múltiplas suturas simples nas incisões verticais e em suspensório nas papilas.

Foi realizada uma radiografia periapical pós-operatória com o uso de posicionador e o paciente foi orientado no sentido de cuidar da área operada. A medicação pré-operatória consistiu de dose única de 4 mg de dexametasona administrada via oral trinta minutos antes do início do procedimento. Após o atendimento foi prescrito dipirona sódica 500 mg, um comprimido a cada quatro horas por até 48 horas, apenas no caso da dor se manifestar ao cessarem os efeitos da anestesia. A remoção da sutura foi realizada depois de um período de sete dias.

### **Cultura microbiana**

Os métodos empregados foram descritos previamente por Gomes *et al.* (1994a,b; 1996; 2004) e Montagner (2009). Os eppendorfs contendo as coletas foram agitados por 60s dentro da câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK), a 37°C numa atmosfera de 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub>. Alíquotas de 50 µL de cada uma destas amostras foram inoculadas em placas de petri contendo diferentes meios de cultura e incubadas em diferentes condições gasosas, como descritos a seguir:

- Placas contendo BHI Agar\* - “Brain Heart Infusion Agar” (Himedia laboratories, Mumbai, India) + 5% de sangue de carneiro, incubadas em estufa de O<sub>2</sub> (aerobicamente) a 37°C por 2 dias, para detecção de anaeróbios facultativos.
- Placas pré-reduzidas de FAA\* - “Fastidious Anaerobe Agar” (Lab M, Bury, UK) contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado + 600 µL de Menadiona (Vitamin K3; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone - SIGMA M5625) + 600 µL de Hemina (Hemin Bovine Minimum 80% – SIGMA H5533) a 37°C em uma atmosfera anaeróbica com 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub> até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento.

Após a incubação, foi analisada a morfologia das colônias nas placas iniciais (Placa mãe) em estereomicroscópio (Lambda Let 2. Atto Instruments Co., Hong Kong) em aumento de três vezes. Cada colônia diferente foi subcultivada para a obtenção de culturas puras. A diferenciação das colônias foi feita de acordo com as suas características macroscópicas na placa, observando-se: tamanho, cor, forma, textura, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no ágar e sangue (ausência, hemólise parcial ou total). A semeadura das placas subseqüentes foi realizada da seguinte forma: cada colônia diferente foi transferida para uma placa de FAA pré-reduzida e para uma placa de BHI ágar sangue. As placas de FAA foram incubadas em câmara de anaerobiose para o crescimento de anaeróbios estritos e as placas de BHI foram incubadas em estufa de O<sub>2</sub> a 37°C, para o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos. Desta forma, as colônias bacterianas foram testadas quanto ao seu requerimento gasoso, ou seja, em qual condição gasosa houve um melhor crescimento bacteriano.

As anaeróbias estritas foram também incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (IG 150 CO<sub>2</sub> Incubator, Jouan S. A., Saint Herblain, Cedex, França), para a diferenciação entre anaeróbias estritas e capnofílicas.

O teste da catalase foi realizado utilizando água oxigenada 15% para diferenciar cocos Gram-positivos aeróbios em *Staphylococcus* spp. (positivos para o teste) e *Streptococcus* spp. (negativos para o teste).

O teste da oxidase foi realizado para diferenciar bacilos Gram-negativos em fermentadores de glicose e não-fermentadores, sendo positivo para os segundos (Anexo VI). A prova é importante na identificação de espécies pertencentes à *Enterobacteriaceae* (todas negativas) de bactérias como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* e *Pasteurella* (todas positivas).

Assim, a identificação microbiana foi desenvolvida nas culturas puras por:

- Morfologia colonial
- Requerimento gasoso
- Caracterização morfológica nas leituras das lâminas destas colônias que receberam a coloração de Gram (Newprov, Produtos para Laboratório, Pinhais, PR, Brasil)
- Reação da catalase
- Teste da oxidase em bactérias Gram-negativas e catalase-positivas

Foram utilizados métodos de identificação comerciais, ou seja, testes bioquímicos em miniatura vendidos em kits padronizados pela Biomérieux (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França). Estes testes bioquímicos possuem reagentes que evidenciam pela mudança de cor em determinados períodos, as exigências nutricionais e compostos específicos produzidos pelas bactérias. Os Kits fornecem gabaritos para finalizar a identificação, que pode ser verificada através do site "<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/watertesting/api/apiweb.htm>".

Os seguintes Kits padronizados foram utilizados para a especificação primária dos microrganismos isolados:

- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os bastonetes Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios.

- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estafilococos e micrococcos (cocos Gram-positivos, catalase-positiva)
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase-negativa)
- API 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para as enterobactérias (Bacilos entéricos Gram-negativos, catalase-positiva, oxidase-negativa).
- API NH (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para Eikenella, Haemophilus, Neisseria e Actinobacillus (cocos e bacilos Gram-negativos e facultativos, oxidase positiva).
- API AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para identificar espécies de Candida.

Todos os tubos de eppendorf contendo VMGAIII imediatamente após a retirada das alíquotas para diluição foram estocados em freezer – 80 °C para futuras análises.

### **Análise estatística**

Os dados coletados foram colocados em uma planilha de cálculo (Microsoft Office Excell 2007, Microsoft Corporation, EUA) e estatisticamente analisados utilizando-se o programa SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicaco, Illinois, EUA). O Teste Qui-quadrado de Pearson ou o Teste Exato de Fisher foram utilizados para testar a hipótese nula que não há relação entre:



a) sinais e sintomas clínicos e a presença de microrganismos específicos nos canais radiculares analisados;

b) pares de bactérias identificados nos canais radiculares. Se a hipótese nula for negada, haverá associação entre pares de espécies e haverá associação estatisticamente significativa entre elas; o que seria calculado através da prevalência individual das espécies, considerando sua distribuição aleatória.

Quando houve associação estatisticamente significativa ao nível de 5%, a proporção populacional expressa como odds ratio ou risco foi empregada para classificar as associações em positivas (Odds ratio > 2,0) ou negativa (Odds ratio < 0,5).

### **Microscopia eletrônica de varredura**

O fragmento removido durante a apicectomia foi imediatamente imerso em solução de tripsina 0,2% para dissolução de fibras periodontais por um período de 24 horas. Foi então fixado em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e cacodilato de sódio 0,1 M, com pH 7-7,4) por uma semana. O espécime foi desidratado em concentrações ascendentes de álcool até 100% seguindo os seguintes passos: imersão em álcool 25%, 50%, 75%, por 20 minutos, álcool 95% por 10 minutos e álcool absoluto por 50 minutos. Em seguida, foi fixado em porta amostra metálico utilizando fita adesiva dupla face de carbono (3M), e coberto com ouro em um metalizador (Balzers - SCD 050 Sputter Coater, BAL-TEC, Germany). A superfície do fragmento apical pode ser observada e estudada sob um microscópio eletrônico de varredura a 15 kV (Jeol JSM – 5600 LV, Japão). A magnificação foi selecionada para analisar o ápice radicular com o material obturador do tratamento inicial extruído (x25), superfície radicular externa

(x100 e x400), forame apical não instrumentado (x200), e colônias de microrganismos aderidas a irregularidades.

### **Processamento histológico**

O processamento foi realizado pelo Serviço de Histopatologia da Área de Patologia Oral da FOP-UNICAMP. As amostras armazenadas em formalina foram lavadas em água corrente por cinco minutos e posteriormente embebidas em parafina. Secções de 5-micrometro de espessura foram feitas dos blocos de parafina, coradas com hematoxilina e eosina (H&E), e examinadas sob microscopia de luz para confirmação do diagnóstico entre cisto e granuloma (Figura 2). As seguintes características foram observadas: presença e distribuição de células inflamatórias agudas (polimorfonucleares, leucócitos) e crônicas, tecido granulomatoso, epitélio linear e cápsula de tecido conjuntivo fibroso.

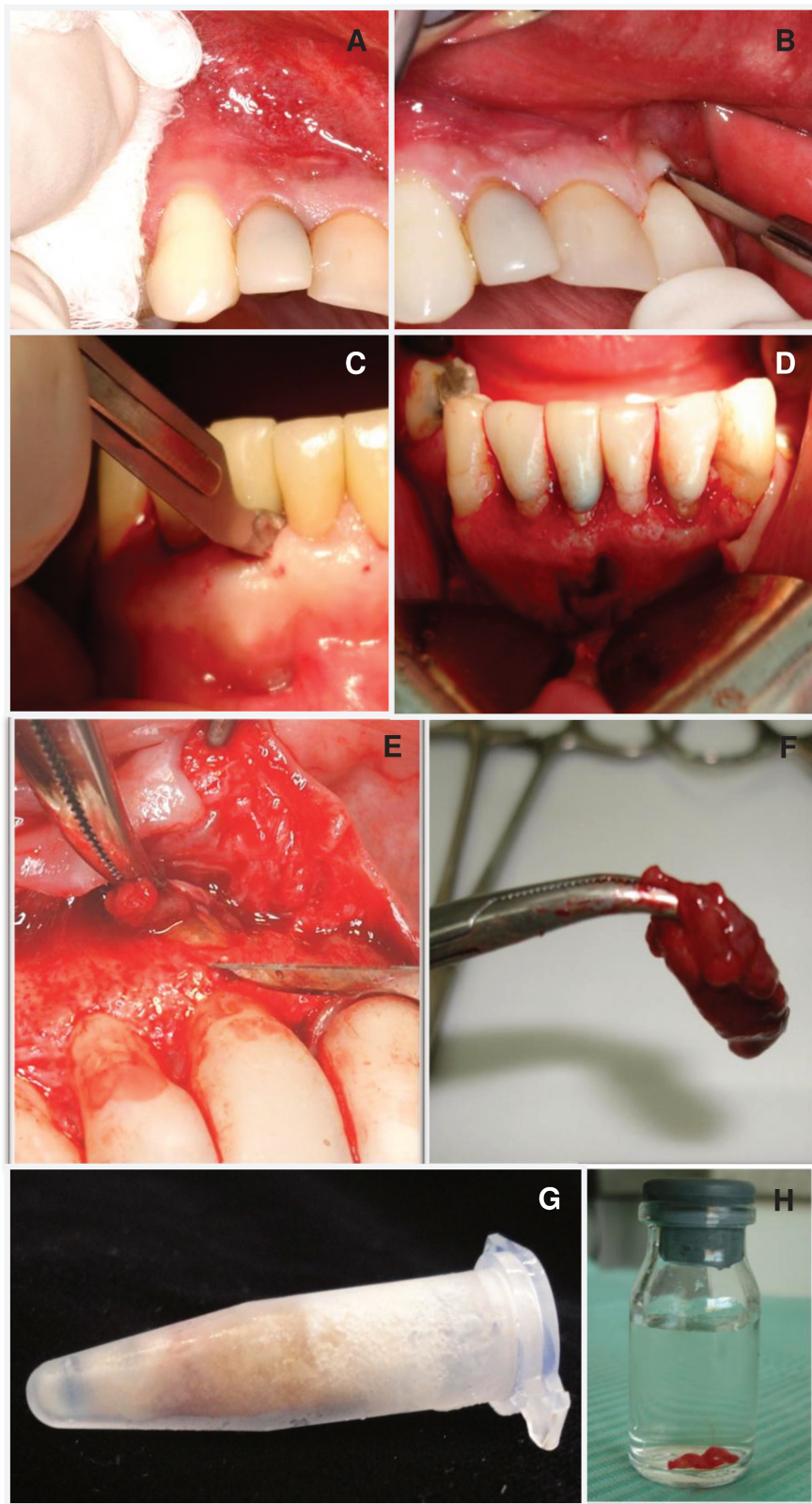


Figura 1. A) Desinfecção do campo operatório; B-D) Incisões intrassulculares e descolamento muco-periosteal; E-F) Remoção do tecido periapical; G) Armazenamento em VMGA II; H) Armazenamento em formol 10%.

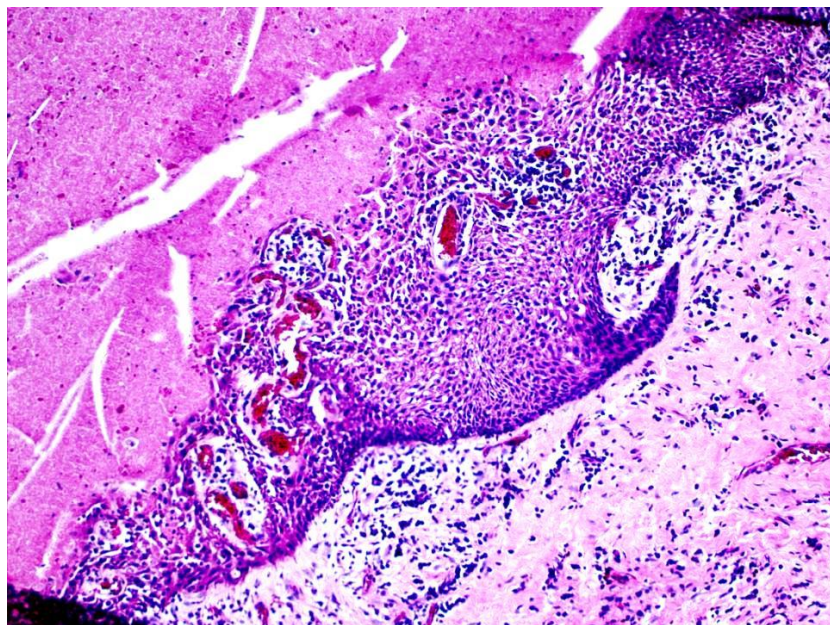


Figura 2. Corte corado com H&E diagnosticado como cisto.

## APÊNDICE 2 – Meio de Transporte

### VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar)

#### 1. Descrição

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

#### 2. Preparo do meio

##### 2.1. Componentes necessários

- a) Acetato de fenilmercúrio;
- b) Glicerofosfato de sódio;
- c) CaCl anidro ou  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- d) KCl
- e)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- f) NaOH
- g) Agar bacteriológico
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)
- j) Thiotona e Peptona (BBL, Cockeyville, EUA)

k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA)

l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA)

Autoclavar previamente:

a) Frascos de Eppendorf ou vidros pequenos com 3 bolinhas de vidro (Glass beads). A quantidade de Eppendorfs é determinada de acordo com o volume que será preparado do meio. Neste caso, para o preparo 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.

b) Proveta de 50mL

c) 2 frascos vazios de 500mL

d) 2 frascos vazios de 1000mL

e) 4 funis

f) 4 tubos de ensaio

g) 4 espátulas

h) 1 frasco de Becker pequeno

i) 2 provetas de 200mL

j) 30 pedaços de papel alumínio

k) 1 vidro de 500mL

## 2.2. Preparo dos volumes líquidos

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

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

\* Colocar um peixinho para ajudar a dissolver a gelatina

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de solução salina.

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

### 2.3. Solução de Sais de Estoque IV

Verificar se tem a solução de sais de estoque IV (cor azul) e autoclavar, caso não tenha, autoclavar:

|          |                               |
|----------|-------------------------------|
| 1 frasco | 60 mL de água bidestilada (1) |
| 1 frasco | 40 mL de água bidestilada (2) |
| 1 frasco | 60 mL de água bidestilada (3) |
| 1 frasco | 40 mL de água bidestilada (4) |

Verificar se tem a solução de NaOH e KOH (8M), caso não tenha, preparar. Volume final de 200 mL. Modo de preparo: Pesar 64g de NaOH e 89,76g de KOH. Dissolver em 140 mL de água bidestilada. Depois de dissolvido, acrescentar água bidestilada q.s.p 200 mL. Autoclavar por 20 minutos.

No dia anterior, preparar as soluções:

a) SOLUÇÃO 1 – Água bidestilada estéril 60mL + Acetato de fenilmercúrio 0,1g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar overnight a 56°C.

b) SOLUÇÃO 2 – Água bidestilada estéril 40mL + Glicerofosfato de sódio 20g.

Dissolver aquecendo levemente na manta e deixar overnight.

No dia do preparo do VMGA III, para preparar a solução azul:

c) SOLUÇÃO 3 – Água bidestilada estéril 60mL + CaCl anidro 0,24g ou  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,32g + KCl 0,84g +  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2g.

Misturar bem as SOLUÇÕES 1, 2 e 3 e resfriar em uma proveta graduada.

Adicionar 40mL de água bidestilada já estéril para completar 200 mL. Ao final, adicionar 0,006g de azul de metileno e acondicionar na geladeira.

#### 2.4. Mistura das soluções e preparo do VMGA II

##### a) Solução A:

| SOLUÇÃO A         | 1000 mL | 250 mL   | 125 mL   |
|-------------------|---------|----------|----------|
| Água bidestilada  | 550 mL  | 137,5 mL | 68,75 mL |
| Triptose          | 0,5 g   | 0,125 g  | 0,0625 g |
| Thitona e Peptona | 0,5 g   | 0,125 g  | 0,0625 g |

##### b) Solução B:

| SOLUÇÃO B        | 1000 mL | 250 mL | 125 mL  |
|------------------|---------|--------|---------|
| Água bidestilada | 300 mL  | 75 mL  | 37,5 mL |
| Gelatina         | 50 g    | 12,5 g | 6,25 g  |

A água bidestilada deve estar pré-aquecida. O frasco com água destilada e o peixinho já devem estar estéreis no dia anterior. Aquecer no micro-ondas por 10 segundos + 10 segundos + 10 segundos (total de 30 segundos),



observando atentamente se derrete a gelatina. Deixar em banho-maria caso não derreta tudo. Essa solução não pode mais ser autoclavada.

c) Solução C:

| SOLUÇÃO C        | 1000 mL | 250 mL  | 125 mL  |
|------------------|---------|---------|---------|
| Água bidestilada | 50 mL   | 12,5 mL | 6,25 mL |
| Ágar             | 2 g     | 0,5 g   | 0,25 g  |

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, manter em banho-maria.

d) Solução D:

| SOLUÇÃO D        | 1000 mL | 250 mL  | 125 mL   |
|------------------|---------|---------|----------|
| Água bidestilada | 10 mL   | 2,5 mL  | 1,25 mL  |
| L-cisteína       | 0,05 g  | 0,125 g | 0,0625 g |

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, manter em banho-maria.

e) Solução E:

| SOLUÇÃO E          | 1000 mL | 250 mL   | 125 mL    |
|--------------------|---------|----------|-----------|
| Solução salina     | 100 mL  | 25 mL    | 12,5 mL   |
| Ácido Tioglicólico | 0,5 mL  | 0,125 mL | 0,0625 mL |

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

Misturar as SOLUÇÕES A + B + C em frasco de 500 mL na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar 25 mL da solução de sais de estoque azul IV. Adicionar a solução de ácido tioglicólico (SOLUÇÃO E). Ferver a solução por 5

minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de  $N_2$ . Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar a solução de cisteína (SOLUÇÃO D).

Ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de NaOH + KOH, adicionando de 10 em 10 microlitros. Adicionar aos poucos, pois não tem volta. A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

Colocar 1 mL da solução em cada eppendorf e deixar levemente aberto na cabine de anaerobiose. Passar parafilme para evitar qualquer tipo de contato com oxigênio e contaminação. Proteger da luz com papel alumínio.

## APÊNDICE 3 – Meios de cultura

### 1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M, Bury, UK.

#### 1.1 Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes detoxificantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento negro.

Agentes específicos de estimulação de crescimento:

- a) Cisteína – para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*;
- b) Arginina – para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*.
- c) Piruvato – contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia.
- d) Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e alcoóis que podem inibir o crescimento bacteriano. O pH médio do meio de cultura é 7,4 ±0,2.

#### 1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas Placas de Petri.

### 1.3. Armazenagem do meio preparado

O meio preparado deve ser armazenado em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

### 1.4. Incubação

a) Temperatura: 37°C;

b) Condições Gasosas: anaerobiose (80% H<sub>2</sub>, 10% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>);

c) Período de tempo: 48 horas e 7 dias.

### 1.5. Fórmula

| Componentes             | Concentração (g/L) |
|-------------------------|--------------------|
| Mistura de peptonas     | 23,0               |
| Cloreto de sódio        | 5,0                |
| Amido solúvel           | 1,0                |
| Ágar nº2                | 12,0               |
| Glicose                 | 0,4                |
| Piruvato de sódio       | 1,0                |
| L-cisteína monoidratada | 1,0                |
| Hemina                  | 0,5                |
| Vitamina K              | 0,001              |
| L-arginina              | 1,0                |
| Pirofosfato solúvel     | 0,25               |
| Succinato de sódio      | 0,5                |

## 1.6. Enriquecimento do meio

### 1.6.1. Solução Vitamina K1 (1 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

Pesar 0,1g de Vitamina K1 e adicionar a um tubo contendo 100 mL de etanol absoluto. Armazenar o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

### 1.6.2. Solução de Hemina (5 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

Dissolver 0,5g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio 1N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121°C por 15 min. Para usar como suplemento, adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

## 2. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) – LAB M (Bury, UK)

### 2.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o potencial de óxido redução do meio e o agar inibe a absorção do oxigênio. O pH do meio é  $7,4 \pm 0,2$ .

### 2.2. Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização, que é feita em autoclave a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.

### 2.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, por até 3 meses, a 15-20°C, fora do alcance da luz.

### 2.4. Incubação

Incubar a 37 °C por 24-72 horas, mantendo os tubos bem fechados.

### 2.5. Fórmula

| Componentes          | Concentração (g/L) |
|----------------------|--------------------|
| Mistura de peptonas  | 15                 |
| Cloreto de sódio     | 2,5                |
| Extrato de levedura  | 1,0                |
| Ágar nº1             | 0,75               |
| L-cisteína           | 0,5                |
| Hemina               | 0,005              |
| Vitamina K           | 0,005              |
| Resazurina           | 0,001              |
| Bicarbonato de sódio | 0,4                |

### **3. Brain Heart Infusion Ágar (BHI) – LAB M (Bury, UK)**

#### **3.1 Descrição**

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição. O pH do meio é  $7,4 \pm 0,2$ .

#### **3.2 Preparo**

Adicionar 24,5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min e resfriada a  $47^{\circ}\text{C}$  antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje, adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de Petri.

#### **3.3. Armazenagem**

Armazenar as placas por período de até sete dias em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , preferencialmente no escuro.

#### **3.4 Incubação**

Tempo e temperatura foram determinados para cada microrganismo

### 3.5 Fórmula

| Componentes                             | Concentração (g/L) |
|-----------------------------------------|--------------------|
| Infusão de sólidos de cérebro e coração | 17,5               |
| Proteose peptone                        | 10,0               |
| Glicose                                 | 2,0                |
| Cloreto de sódio                        | 5,0                |
| Fosfato dissódico                       | 2,5                |
| Agar número 2                           | 12,0               |

## 4. Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK)

### 4.1. Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e petonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido. O pH do meio é  $7,4 \pm 0,2$ .

### 4.2. Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos, sendo a seguir dissolvida sob aquecimento brando, antes de ser dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização. A esterilização é feita em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.



#### 4.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, até três meses a 15-20°C protegidos da luz.

#### 4.4. Incubação

Incubar aerobicamente a 37°C por até 15 dias.

#### 4.5. Fórmula

| Componentes                          | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------|--------------------|
| Infusão de sólidos de cérebro de boi | 12,5               |
| Infusão de sólidos de coração        | 5,0                |
| Proteose peptone                     | 10,0               |
| Glicose                              | 2,0                |
| Cloreto de sódio                     | 5,0                |
| Fosfato dissódico                    | 2,5                |



## APÊNDICE 4 – Coloração de Gram

### 1. Princípios

É utilizada para observação microscópica direta das amostras para a caracterização das bactérias quanto a sua morfologia e quanto as características de sua parede celular.

Emprega como corantes o cristal violeta, o iodo de Gram, o descorante (álcool-acetona) e o contracorante (safranina ou fucsina). O cristal violeta (violeta de genciana) serve como coloração primária, unindo-se à parede celular bacteriana após o tratamento com uma solução de iodo fraco, que serve como mordente para a ligação do corante. Algumas espécies bacterianas, devido à natureza química da parede celular, têm a capacidade de reter o cristal violeta, mesmo depois do tratamento com um descorante orgânico, como a mistura de partes iguais de álcool etílico a 95% e acetona. As bactérias que retêm o corante aparecem negro-azuladas quando observadas ao microscópio e são denominadas gram-positivas. Certas bactérias perdem a coloração primária com cristal violeta quando são tratadas com o descorante, talvez devido ao alto conteúdo lipídico da parede celular, sendo denominadas Gram-negativas. Assim, com a aplicação do contracorante, apresentam-se avermelhadas quando visualizadas no microscópio.

### 2. Componentes

#### a) Cristal Violeta

| Componentes          | Quantidade |
|----------------------|------------|
| Cristal violeta      | 2 g        |
| Álcool etílico a 95% | 20 mL      |

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Oxalato de NH <sub>4</sub> | 0,08 g |
| Água destilada             | 100 mL |

b) Iodo de Gram

| Componentes        | Quantidade |
|--------------------|------------|
| Iodeto de potássio | 2 g        |
| Cristais de iodo   | 1 g        |
| Água destilada     | 100 mL     |

c) Descorante

| Componentes          | Quantidade |
|----------------------|------------|
| Acetona              | 50 mL      |
| Álcool etílico a 95% | 50 mL      |

d) Contracoloração

| Componentes          | Quantidade |
|----------------------|------------|
| Safranina            | 2,5 g      |
| Álcool etílico a 95% | 100 mL     |
| Água destilada       | 100 mL     |

### 3. Procedimentos

- a) Fazer sobre uma lâmina um esfregaço delgado do material em estudo e deixar secar no ar.
- b) Fixar o material na lâmina, utilizando-se o calor da chama no Bico de Bunsen.
- c) Colocar a lâmina em um suporte para coloração.
- d) Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, por 1 minuto. Lavar em água corrente.
- e) Cobrir o esfregaço com a solução de iodo de Gram, por um minuto. Lavar em água corrente.
- f) Aplicar o decolorante por 15 segundos sobre a lâmina.
- g) Imediatamente, cobrir a lâmina com contracolorante, por 30 segundos a 1 minuto.
- h) Deixar secar no ar, colocando a lâmina em posição vertical.
- i) Examinar em microscópio óptico, com óleo de imersão, com aumento de x100.



## **APÊNDICE 5 – Teste de Catalase**

### **1. Procedimentos**

Empregar colônias novas, com 24 a 72 horas de crescimento, preferencialmente de meios que não contenham agar. Com uma alça, colher uma porção da colônia e dispensar sobre uma lâmina de vidro estéril. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio 15%.

### **2. Interpretação dos resultados**

- a) Reação positiva: formação de bolhas imediata
- b) Reação negativa: ausência de formação de bolhas. Formação de bolhas após 20 a 30 segundos ocorrem, pois algumas bactérias apresentam outras enzimas capazes de degradar peróxido de hidrogênio.





## APÊNDICE 6 – Teste da Oxidase – Bactident Oxidase (Merck, Alemanha)

### 1. Princípios

Os citocromos são proteínas que atuam como último elemento de ligação na cadeia respiratória aeróbia, transferindo hidrogênios ao oxigênio, com formação de água. O sistema citocromo é encontrado em microrganismos aeróbios, ou anaeróbios facultativos. Assim, a prova da oxidase é importante para identificação de microrganismos que carecem da enzima e são anaeróbios obrigatórios. A prova é importante na identificação de espécies pertencentes à Enterobacteriaceae (todas negativas) e de bactérias como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* e *Pasteurella* (todas positivas).

A prova da citocromo-oxidase utiliza corantes que substituem o oxigênio como aceitor artificial de elétrons. No estado reduzido, o corante é incolor; entretanto, em presença de citocromo oxidase e de oxigênio atmosférico, a p-fenilenodiamina é oxidada e forma azul-de-indofenol.

### 2. Procedimentos

- a) Realizar uma diluição da colônia em água bidestilada
- b) Aplicar o a fita impregnada com o corante
- c) Aguardar de 15 a 20 segundos.

### 3. Resultados (após 15 a 20 segundos)

- a) Positivo – coloração roxa ou preta.
- b) Negativo – coloração amarela.



## APÊNDICE 7 – Kits de identificação microbiana

### 1. API 20 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

#### 1.1. Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos

que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos *Streptococcus* encontrados na microbiologia médica.

A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes.

Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH.

As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo “Api 20 Strep Analytical Profile Index”, ou via site do fabricante na internet.

#### 1.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37°C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das

amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4. Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de “API GP Medium” e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP.

Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta e os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”, ou no site do fabricante.

## **2. Rapid ID 32 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France**

### **2.1 Descrição**

Rapid ID 32 Strep é um sistema de identificação para estreptococos e microrganismos relacionados utilizando testes enzimáticos estandardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas que são utilizadas para testes e contém substratos desidratados.

Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index” ou o site do fabricante na internet.

### **2.2. Procedimentos para identificação**

Microrganismos são cultivados em placas ágar sangue. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamente por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP A e VP B no teste do VP (cúpula 0.0); FB nos testes APPA a GTA (cúpulas 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5); e NIN no teste de HIP (cúpula 0.6). Todas as reações são lidas após 5 minutos baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta e os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index” ou a leitura é feita site do fabricante na internet.

### **3. API Staph - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France**

#### **3.1. Descrição**

Api Staph (#20500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio “Api Staph Medium” que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de “Api Staph Medium”, folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index” ou no site do fabricante na internet.

#### **3.2. Procedimentos para identificação**

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Api Staph Medium” para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5. Cinco mL de

água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Staph com o inóculo bacteriano preparado no “Api Staph Medium”, evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contendo os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C por 18-24 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido b-naftil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index”.

#### **4. Rapid ID 32 A - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France**

##### **4.1. Descrição**

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou o site do fabricante na internet.

#### 4.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Ágar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37°C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C em anaerobiose por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou no site do fabricante.

### 5. Api 20 C AUX

#### 5.1 Descrição

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica. O API 20 C AUX consiste em 20



microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e identificação é obtida pelo catálogo Analytical Profile Index ou usando um programa computadorizado de identificação.

## 5.2. Procedimentos para identificação

Microorganismos são cultivados em placas de Agar Sabouraud 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria em 2 mL meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 µ L no tubo “C Medium”. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas. Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula “0” da galeria) para ser interpretada a leitura de toda galeria. Através do catálogo “Analytical Profile Index” os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

## 6. RapID NH system - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA

### 6.1. Descrição

O sistema RapID NH é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, e também *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencionais e cromogênico.

Cada Kit consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para resultados e um manual de instruções. Após 4 horas de incubação as reações são obtidas através da leitura visual. Identificações são realizadas usando cada escore de teste individual, em conjunto com as informações obtidas através da morfologia colonial, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. O resultado padrão do escore positivo e negativo é usado como base para identificação do teste isolado pela comparação dos resultados obtidos com resultado padrão que é encontrado no manual de dados (RapID NH System Code Compendium).

O recipiente de teste RapID NH e reagentes devem ser estocados a 2-10°C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30°C, na embalagem original.

## 6.2. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos

do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado. Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor. O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.



## APÊNDICE 8 – Produção bibliográfica da aluna

1. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. J Endod 2008; 34(12): 1451-6.
2. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. J Endod 2010; 36(11): 1796-9.
3. Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011; 111(5): 653-8.
4. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. J Endod 2011; 37(12): 1696-700.
5. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. J Endod 2012; 38(2): 158-62.
6. Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC. Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with chronic apical periodontitis (Submitted to Journal of Endodontics).



## ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 5/14/12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado |                                                                       | <b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b><br><b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA</b><br><b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> |  |
| <b>CERTIFICADO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
| <p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "<b>Avaliação microbiológica de lesões periapicais crônicas associadas ao insucesso do tratamento endodôntico</b>", protocolo nº 065/2010, dos pesquisadores Fernanda Graziela Corrêa Signoretti e Rogério de Castilho Jacinto, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/07/2010.</p>                                                             |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
| <p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "<b>Bacteriological evaluation of periapical lesions associated with endodontic retreatment failures</b>", register number 065/2010, of Fernanda Graziela Corrêa Signoretti and Rogério de Castilho Jacinto, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/07/2010.</p> |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
| <b>Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas</b><br>Secretário<br>CEP/FOP/UNICAMP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                           | <b>Prof. Dr. Jacks Jorge Junior</b><br>Coordenador<br>CEP/FOP/UNICAMP |                                                                                                                                 |  |
| <p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.<br/>Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
| <a href="http://www.fop.unicamp.br/cep/sistema/certificado.php?P_rotocolo=065/2010&amp;id=726&amp;Passo=2&amp;dataPar=2010-07-07">www.fop.unicamp.br/cep/sistema/certificado.php?P_rotocolo=065/2010&amp;id=726&amp;Passo=2&amp;dataPar=2010-07-07</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |
| 1/1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                           |                                                                       |                                                                                                                                 |  |